

TESE DE DOUTORAMENTO

**RNAi, UNA NUEVA ESTRATEGIA  
TERAPÉUTICA EN CARCINOMA  
ANAPLÁSICO DE TIROIDES**

Joana Sousa Rodrigues

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN ENDOCRINOLOGIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2019





# DECLARACIÓN DO AUTOR DA TESE

## RNAi, UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN CARCINOMA ANAPLÁSICO DE TIROIDES

D<sup>a</sup>. Joana Sousa Rodrigues

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao  
Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

*En Santiago de Compostela, 15 de Abril de 2019*

Asdo.: Joana Sousa Rodrigues





## AUTORIZACIÓN DOS DIRECTORES DA TESE

RNAi, UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN  
CARCINOMA ANAPLÁSICO DE TIROIDES

Dna. Clara Alvarez Villamarín  
D. José Manuel Cameselle Teijeiro

INFORMAN:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D. **Joana Sousa Rodrigues** baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 15 de Abril de 2019.*

Asdo.: Prof. Clara Álvarez  
Villamarín

Asdo.: Prof. José Manuel  
Cameselle Teijeiro



## **Dedicatória**

*Aos meus pais*



Tudo vale a pena quando a alma não é pequena

**Fernando Pessoa**

*Mensagem*



## **Financiación**



Este estudio ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Proyecto PI15/01501-FEDER- Instituto de Salud Carlos III (IP: José M. Cameselle Teijeiro), y por la Agencia Estatal de Investigación y Fondo Social Europeo, Proyecto BFU2016-76973-R FEDER (IP: Clara V Álvarez).

La doctoranda Joana Rodrigues Sousa ha recibido una beca predoctoral del IDIS (Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, FIDIS). Ha estado además contratada por proyectos MINECO (BFU2010-16652; BFU2013-46109) y de la Red de la Xunta de Galicia (XUGA CN 2012/142 (2013-PN 088) y ED341D R2016/036 (2016 GI-1233) (con apoyo de Fondos FEDER).



## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todas las personas que directa o indirectamente han contribuido, me han ayudado y apoyado durante todos estos años a concretizar esta tesis.

Agradecer a las instituciones: Universidad de Santiago de Compostela y al Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS).

Agradezco a mis directores de tesis, la Prof. Dra. Clara Alvarez Villamarin y el Prof. Dr. José Manuel Cameselle Teijeiro, por las oportunidades y dedicación que me han dado y por todo lo que me han enseñado a lo largo de estos años.

Gracias a todos los investigadores principales, a mis compañeros y técnicos de los demás grupos, desde los tiempos en el departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina hasta en el CIMUS.

En especial agradezco a mi grupo de Neoplasia y Diferenciación Endocrina del CIMUS: Sihara Perez, María del Carmen Suarez, Angela García-Rendueles, Montserrat García-Labandeira y a los de la nueva generación: Miguel Chenlo, Fernando Oroz y Alberto Pradilla. Agradezco también a los que pertenecieron al grupo, pero que ya no hacen parte de él: Susana Bravo, María García-Rendueles, Esther Diaz, Xaquín y Brais.

Por último, quiero agradecer a mi familia y amigos pues sin ellos esta tesis tampoco sería posible.

A todos MUITO OBRIGADA.





## Resumen

El carcinoma anaplásico de tiroides (ATC) tiene una incidencia baja, pero es letal, con raros casos sobreviviendo más que pocos meses. Actualmente no hay ensayos clínicos específicos ni terapias eficaces. Nuestro grupo ha establecido un sistema en el que se cultivan de forma estandarizada cáncer de tiroides de pacientes en paralelo a sus muestras benignas/normales para estudiar diferencias específicas del cáncer.

Mediante proteómica diferencial entre muestras de cáncer y células benignas, se ha encontrado una proteína PIAS2 más expresada en cáncer de tiroides. Se ha diseñado un RNA de interferencia (dsRNAi) específico de la isoforma beta. PIAS2b dsRNAi induce la muerte de células anaplásicas, pero no afecta a células de carcinoma diferenciado. Mediante técnicas de biología celular y molecular y un modelo *in vivo* de PDX ortotópico demostramos que PIAS2 es esencial en la mitosis de las células anaplásicas y su reducción provoca catástrofe mitótica. En suma, PIAS2b es una diana terapéutica específica en ATC.

**PALABRAS CLAVE:** Tiroides, cáncer de tiroides, cáncer anaplásico, RNA de interferencia dsRNAi, mitosis, PIAS2, isoformas RNA, proteómica, catástrofe mitótica



## Abstract

Anaplastic thyroid carcinoma (ATC) has a low incidence but is lethal, with rare cases of survival for more than a few months. There are no specific clinical trials nor effective therapies. Our group has established a system where thyroid cancer from patients is cultivated in a standardized way parallelly with their benign/normal samples in order to study specific differences from the cancer.

Through differential proteomics between cancer and benign samples, a PIAS2 protein more expressed in thyroid cancer was discovered. An RNA interference (dsRNAi) specific for beta isoform was designed. PIAS2b dsRNAi induces death of anaplastic cells without affecting differentiated carcinoma cells. Through cellular and molecular biology techniques and an *in vivo* orthotopic PDX model it was demonstrated that PIAS2 is essential for the mitosis of the anaplastic cells and their reduction induces mitotic catastrophe. PIAS2b is a specific therapeutic target in ATC.

KEY WORDS: Thyroid, thyroid cancer, anaplastic thyroid cancer, double stranded interference RNA dsRNAi, mitosis, mitotic catastrophe, PIAS2, RNA isoforms, proteomics



## Resumo

O carcinoma anaplásico de tiroide ( ATC) ten unha incidencia baixa pero é letal, con raros casos sobrevivindo máis que poucos meses. Non hai ensaios clínicos específicos nin terapias eficaces. O noso grupo estableceu un sistema no que se cultivan de forma estandarizada cancro de tiroide de pacientes en paralelo ás súas mostras benignas/normais para estudar diferenzas específicas do cancro.

Mediante proteómica diferencial entre mostras de cancro e benignas, atopouse unha proteína PIAS2 máis expresada en cancro de tiroide. Diseñouse un RNA de interferencia ( dsRNAi) específico da isoforma beta. PIAS2 b dsRNAi induce a morte de células anaplásicas, pero non afecta a células de carcinoma diferenciado. Mediante técnicas de bioloxía celular e molecular e un modelo *in vivo* de PDX ortotópico demostramos que PIAS2 é esencial na mitosis das células anaplásicas e a súa redución provoca catástrofe mitótica. En suma, PIAS2b é unha diana terapéutica específica en ATC.

PALABRAS CHAVE: Tiroide, cancro de tiroide, cancro anaplásico, RNA de interferencia dsRNAi, mitosis, PIAS2, isoformas RNA, proteómica, catástrofe mitótica



## ÍNDICE







	<i>pág</i>
<b>Abreviaturas y Acrónimos</b>	27
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	35
I.1 La glándula tiroides y los cánceres de tiroides	37
I.1.1 La glándula tiroides	37
I.1.2 Tumores de la glándula tiroides	38
I.2 Tratamientos del Cáncer de Tiroides	46
I.2.1 Tratamiento del Carcinoma Diferenciado de Tiroides	46
I.2.1.1 Cirugía	47
I.2.1.2 Terapia con yodo radiactivo	49
I.2.1.3 Cáncer avanzado de tiroides	50
I.2.2 Carcinoma anaplásico de tiroides	53
I.3 Interferencia con la expresión de RNA: una potencial vía de nuevos tratamientos	62
I.3.1 El RNA de interferencia (RNAi)	62
I.3.1.1 Los genes miRNA y el mecanismo natural de RNAi	63
I.3.1.2 Los shRNA sintéticos	67
I.3.2 Oligonucleótidos antisentido (ASOS)	69
I.3.3 Los dsRNAi (considerados como los verdaderos siRNAs)	73
I.3.4 Modificaciones y métodos de distribución de los RNAi en su potencial uso como terapia	74
I.3.5 Terapias RNA aprobados por la FDA	80
I.4 La división celular: del ciclo celular a la mitosis	85
I.4.1 Entrada en la mitosis y el G2/M <i>checkpoint</i>	88
I.4.2 El ciclo del Centrosoma	90
I.4.3 Los puntos de control molecular de Mitosis: <i>checkpoint</i> del ensamblaje del huso mitótico (SAC); <i>checkpoint</i> del complejo promotor de la anafase (APC/C) y el complejo de <i>checkpoint</i> mitótico (MCC)	94

I.4.3.1 Red del complejo KNL1-MIS12 y complejo NDC80 (KMN)	98
I.4.3.2 El complejo pasajero cromosómico: <i>chromosome passenger complex</i> , CPC	102
I.4.4 Salida de la mitosis y citokinesis	105
I.4.4.1 Salida de la mitosis	105
I.4.4.2 Citokinesis	106
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	109
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	115
III. 1 Aspectos éticos:	117
III. 2 Declaración de conflictos de interés	117
III. 3 Cultivos Celulares	117
III.3.1 Cultivos primario de células foliculares	117
III. 3.2 Cultivo de líneas celulares comerciales	122
III.3.3 Sembrado de células para los diferentes experimentos	123
III. 4 Estudios funcionales en células	124
III. 4.1 Estudio de proliferación celular	124
III. 4.2 Estudio de muerte celular	124
III. 4.2.1 Contaje de Apoptosis	125
III. 4.2.2 Inhibidores de muerte celular	125
III. 4.3 Estudio del ciclo celular	126
III. 4.3.1 Citometría de flujo	126
III. 4.3.2 Estudio de mitosis	128
III. 4.3.3 Videomicroscopía ( <i>Time-Lapse</i> )	129
III. 4.4 Estudios de sobreexpresión de PIAS2	130
III.5 RNA de interferencia	131
III.5.1 Pequeño RNA de interferencia de doble cadena ( <i>double-stranded small interfering RNA</i> , dsRNAi)	131

III.5.5.1 Análisis <i>in silico</i> : diseño de los dsRNAi	131
III.5.5.2 Transcripción de las secuencias molde los dsRNAi	133
III.5.5.3 Síntesis de los dsRNAi	134
III.5.5.4 Preparación y purificación de los dsRNAi	135
III.5.2 <i>Antisense</i> LNA GapmeRs	136
III.6 Transfecciones transitorias dsRNAi y plásmidos	138
III.6.1 Purificación de los plásmidos	138
III.6.2 Métodos de transfección en cultivos primarios y líneas celulares	141
III.6.2.1 Nucleofección Amaxa	141
III.6.2.2 Transfección lipídica	142
III.7 Generación de poblaciones estables mediante transducción viral	146
III.7.1 Lentivirus y retrovirus	147
III.7.2 Producción de lentivirus/retrovirus	147
III.7.3 Concentración de las partículas retrovirales	151
III.7.4 Titulación viral por qPCR	151
III.7.5 Titulación viral funcional	153
III.7.6 Transducción viral	155
III.8 Estudios DNA	158
III.8.1 Extracción de DNA	158
III.8.2 Cuantificación de DNA	159
III.8.3 Perfil STRs	159
III.9 Estudio de RNA	159
III.9.1 Extracción de RNA	159
III.9.2 Retrotranscripción de RNA a cDNA	160
III.9.3 PCR cuantitativa	161
III.10 Estudio de proteínas	163

III.10.1 Proteómica 2D	163
III.10.2 Relación de anticuerpos utilizados	165
III.10.3 Extractos de proteína de cultivos	169
III.10.3.1 Método de extracción de proteína con tampón de lisis de Triton ( <i>Schlessinger Lysis Buffer</i> )	169
III.10.3.2 Cuantificación de la concentración de proteína	170
III.10.4 Electroforesis y transferencia de proteínas	171
III.10.5 Inmunodetección en membrana	173
III.10.6 Inmunoprecipitación	177
III.10.6.1 Inmunoprecipitación para identificación proteómica	178
III.10.6.2 Espectrometría de masas: digestión trípica del IP	179
III.10.6.3 Espectrometría de masas: Ensayos cualitativos DDA (data-dependent acquisition) y LC-MS/MS (triple TOF 6600 SCIEX)	180
III.10.7 Tratamiento con lambda fosfatasa	182
III.10.8 Inmunohistoquímica	183
III.10.9 Inmunofluorescencia	184
III.11 Estudios in vivo	185
III.11.1 Generación de las poblaciones de células para medir Bioluminescencia	185
III.11.2 Modelo ortotópico de xenoimplante de células de carcinoma anaplásico de tiroides de pacientes en ratón NOD-SCID (oPDX)	185
III.11.3 IVIS: Ensayo de medición de bioluminiscencia <i>in vivo</i>	188
III.11.4 Tratamientos dsRNAi <i>in vivo</i>	189
III.11.5 Terminación del experimento <i>in vivo</i>	193
III.11.6 Anatomía patológica de las piezas quirúrgicas disecadas conteniendo los oPDX	194
III.12 Análisis estadístico	194
<b>IV. RESULTADOS</b>	197
IV.1 Estudio de expresión diferencial mediante 2D-proteómica	199

IV.2 El gen PIAS2 y sus isoformas	206
IV.3 Validación del modelo de líneas celulares comerciales de cáncer de tiroides	212
IV.4 Las proteínas PIAS2: caracterización y validación de dos anticuerpos.	218
IV.5 Expresión de PIAS2 en tejidos de tiroides de pacientes	228
IV.6 Efecto de la represión de PIAS2b con dsRNAi en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de tiroides	230
IV.7 Sobreexpresión de PIAS2b o PIAS2a también tiene un efecto tóxico	256
IV.8 Efectividad de otros métodos comerciales para reprimir la expresión de PIAS2b	258
IV.9 Mecanismo antiproliferativo de PIAS dsRNAi 1: muerte celular	270
IV.10 PIAS2 se acumula en mitosis y participa en el huso mitótico	292
IV.11 PIAS2 se une a AURKA y a Tubulina gamma	300
IV.12 PIAS2 dsRNAi 1 bloquea la mitosis desde su comienzo generando alteraciones centrosómicas y parada en la dinámica de los kinetocoros	316
IV.13 PIAS2 dsRNAi 1 tiene efecto antitumoral en oPDX, un modelo preclínico in vivo	329
<b>V. DISCUSIÓN</b>	345
V.1 La función de PIAS2. Visión histórica de las funciones propuestas para la familia PIAS co-activador / co-represor de la transcripción o E3 SUMO ligasa	347
V.1.1 Papel de PIAS2 como regulador transcripcional en transducción de señales	352
V.1.2 Papel de PIAS2 en regulación del sistema inmune y defensa anti-viral.	354
V.1.3 Papel de PIAS2 en el sistema nervioso.	356
V.1.4 Los otros miembros de la familia PIAS: PIAS1, PIAS3 y PIAS4	356
V.2 Dificultades en el estudio de las isoformas de mRNA y proteína PIAS2	358
V.3 PIAS2 en carcinoma diferenciado papilar de tiroides: un marcador pronóstico con una función –no esencial- en interfase	362
V.4 PIAS2 en carcinoma anaplásico de tiroides: una función esencial en mitosis con posibilidades terapéuticas	373
V.4.1 PIAS2 dsRNAi 1 un antitumoral citotóxico en cultivos <i>in vitro</i>	373

V.4.2 PIAS2 dsRNAi 1 provoca catástrofe mitótica	377
V.4.3 PIAS2 una proteína esencial para la mitosis de células anaplásicas	379
V.4.4 PIAS2 dsRNAi1 un antitumoral citotóxico en oPDX in vivo	393
<b>VI. RESUMEN DE RESULTADOS</b>	400
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	406
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	410
<b>Lista de Imágenes</b>	488
<b>Lista de Figuras</b>	490
<b>Lista de Tablas</b>	492
<b>Apéndices</b>	496



## Abreviaturas y Acrónimos

<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>AIP</b>	Porfiria intermitente aguda
<b>AKT</b>	<i>Serine/threonine kinase</i>
<b>ALK</b>	<i>ALK receptor tyrosine kinase</i>
<b>APC</b>	Complejo promotor de la anafase
<b>APC/C</b>	Complejo promotor de la anafase/ ciclosoma
<b>ARPP19</b>	<i>CAMP Regulated Phosphoprotein 19</i>
<b>ASGPR</b>	Asialoglucoproteína de hepatocitos
<b>ASO</b>	Oligonucleótidos antisentido
<b>ATA</b>	Asociación Americana de Tiroides, American Thyroid Association
<b>ATC</b>	Carcinoma indiferenciado ( <i>Undifferentiated or Anaplastic Thyroid carcinoma</i> )
<b>ATM</b>	<i>Ataxia-Telangiectasia Mutated Serine/Threonine Kinase</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATR</b>	<i>Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related Serine/Threonine Kinase</i>
<b>AURKA</b>	Aurora kinasa a
<b>BET</b>	Bromodominio extra-terminal
<b>BIRC5</b>	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing 5 protein</i>
<b>BLAST</b>	<i>Basic local alignment search tool</i>
<b>BORA</b>	<i>BORA Aurora Kinase A Activator</i>
<b>BRAF</b>	Gen llamado B-Raf proto-oncogene
<b>BRAFV600</b>	Proteína BRAF no mutada
<b>BRAFV600E</b>	Proteína BRAF mutada en la Valina 600 a Glutámico
<b>BRCT</b>	<i>BRCA1 C-terminal</i>
<b>BUB1</b>	<i>BUB1 Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase</i>
<b>BUB3</b>	<i>BUB3 Mitotic Checkpoint Protein</i>
<b>BUBR1</b>	<i>BUB1 Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase B</i>
<b>CCAN</b>	<i>Constitutive centromere-associated network</i>
<b>CDC14B</b>	<i>Cell Division Cycle 14B protein</i>
<b>CDC20</b>	<i>Cell Division Cycle 20 protein</i>
<b>CDC25C</b>	<i>Cell Division Cycle 25C protein</i>
<b>CDCA8</b>	<i>Cell Division Cycle Associated 8 protein</i>
<b>CDK1</b>	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
<b>CDK2</b>	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
<b>CDK4</b>	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
<b>CDK6</b>	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>
<b>CEA</b>	Antígeno carcinoembrionario

<b>CENP-C</b>	<i>Centromere Protein C</i>
<b>CENP-E</b>	<i>Centromere Protein E</i>
<b>CEP192</b>	<i>Centrosomal Protein 192 kDa</i>
<b>CEP215</b>	<i>CDK5 Regulatory Subunit Associated Protein 2</i>
<b>CEP250</b>	<i>Centrosomal Protein 250 kDa</i>
<b>CEP55</b>	<i>Centrosomal Protein 55 kDa</i>
<b>CEP57</b>	<i>Centrosomal protein of 57 kDa</i>
<b>CH</b>	Dominios globulares
<b>CHK1</b>	<i>Checkpoint Kinase 1</i>
<b>CHK2</b>	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
<b>CHUS</b>	Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela
<b>CMV</b>	<i>Cytomegalovirus promoter</i>
<b>CPC</b>	Complejo pasajero cromosómico, <i>chromosome passenger complex</i>
<b>CR</b>	<i>Complete response</i>
<b>CT</b>	Calcitonina
<b>CTNNB1</b>	B-catenina 1
<b>DAPI</b>	Marcador nuclear fluorescente, 4' 6-diamino-2-fenilindol
<b>dCTP</b>	<i>Deoxycytidine triphosphate</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido, <i>dimethyl sulfoxide</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DOR</b>	Duración media de la respuesta, <i>Duration of response</i>
<b>DRS</b>	<i>Dynamic risk stratification</i>
<b>dsRNAi</b>	RNA de interferencia de doble cadena
<b>DT</b>	Doble bloqueo de Timidina
<b>DTC</b>	Carcinoma diferenciado ( <i>Differentiated Thyroid Carcinoma</i> )
<b>dTTP</b>	<i>Thymidine triphosphate</i>
<b>ECT2</b>	(factor intercambiador GDP por GTP
<b>EG5</b>	<i>Kinesin-like protein</i> o KIF11
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
<b>EMA</b>	Agencia Europea de Medicamentos, <i>European Medicines Agency</i>
<b>eP</b>	<i>Early Prophase</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
<b>ESCRT</b>	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>
<b>FA</b>	Adenoma folicular ("Follicular Adenoma")
<b>Fcp1</b>	<i>RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase</i>
<b>FDA</b>	Alimentos o Administración de Alimentos y Medicamentos, <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FDR</b>	<i>Global false discovery rate</i>
<b>FFPE</b>	Formalin-fixed paraffin-embedded
<b>FiJi</b>	Software de procesamiento de imágenes, antiguamente llamado Image J
<b>FoxA1</b>	Factor de transcripción Forkhead box E1



<b>FTC</b>	Carcinoma folicular
<b>FV PTC</b>	Variante folicular de CP
<b>G1</b>	Gap1 del ciclo celular
<b>G2</b>	Gap2 del ciclo celular
<b>GalNAc</b>	N-acetilgalactosamina trivalente
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase protein</i>
<b>GapmeRs</b>	<i>Locked nucleic acid-conjugated chimeric antisense oligonucleotide</i>
<b>GCP8</b>	<i>Mitotic Spindle Organizing Protein 2A</i>
<b>GCPs</b>	Llamados Proteínas Componentes del Complejo tubulina- $\gamma$ o GRIP
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>GRIP</b>	Llamados Proteínas Componentes del Complejo tubulina- $\gamma$ o gcps
<b>gTub</b>	<i>Tubulin Gamma protein</i>
<b>GWL</b>	Proteína Greatwall
<b>h</b>	Horas
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina-eosina
<b>HAP</b>	Porfirias hepáticas agudas
<b>HCC</b>	<i>Hürthle Cell Carcinoma</i>
<b>HDAC</b>	<i>Histone Deacetylase</i>
<b>HEC1</b>	<i>NDC80 Kinetochore Complex Component</i>
<b>HER2</b>	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> , Receptor Erbb2 tirosina kinasa
<b>HER3</b>	<i>Human epidermal growth factor receptor 3</i> , Receptor Erbb3 tirosina kinasa
<b>HPLC</b>	<i>High performance liquid chromatography</i>
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano, Horseradish peroxidase
<b>I131</b>	Yodo131
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>ICLAC</b>	<i>International Cell Line Authentication Committee</i>
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>INCENP</b>	<i>Scaffold Inner Centromeric protein</i>
<b>IRES</b>	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
<b>IVIS</b>	<i>In vivo imaging system</i>
<b>Ki67</b>	Marcador de proliferación Ki-67
<b>KIF11</b>	<i>Kinesin-like protein</i> o EG5
<b>KMN</b>	Red del complejo KNL1-MIS12 y complejo NDC80
<b>KNL1-C</b>	<i>Kinetochore Complex with components: KNL1 y Zwint-1</i>
<b>KRAS</b>	<i>KRAS Proto-Oncogene, GTPase</i>
<b>laC</b>	<i>Late Cytokinesis</i>
<b>LASX</b>	Software de manejo del microscopio confocal Leica SP5, Leica Application Suite Advanced Fluorescence
<b>LB</b>	<i>Luria bertani</i>

<b>LC-MS/MS</b>	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>
<b>LDL</b>	<i>Low density lipoproteins</i>
<b>LNA</b>	<i>Locked Nucleic Acids single-stranded antisense oligoribonucleotides</i>
<b>lncRNAs</b>	RNA largos no codificantes
<b>LNP</b>	Nanopartículas lipídicas
<b>MAD1</b>	<i>Mitotic Arrest Deficient 1 Like 1</i>
<b>MAD2</b>	<i>Mitotic Arrest Deficient 2 Like 1</i>
<b>MASTL</b>	Gene de la proteína Greatwall
<b>MCC</b>	Mitotic checkpoint complex
<b>MCM5</b>	<i>Minichromosome Maintenance Complex Component 5</i>
<b>MEK</b>	Serina/Treonina/Tirosina Kinasa activadora de ERK, Mitogen-activated protein kinase kinase
<b>mer</b>	<i>Length of the oligonucleotide</i>
<b>MET</b>	<i>MET receptor tyrosine kinase</i>
<b>min</b>	Minutos
<b>miRNA</b>	MicroRNA
<b>MIS12-C</b>	<i>Kinetochore Complex with components: NNF1, MIS12, DSN1, and NSL1/MIS14</i>
<b>MKI</b>	Inhibidores multikinasa
<b>MKLP1</b>	<i>Kinesin-like protein KIF23 y antes llamada Mitotic kinesin-like protein 1</i>
<b>MKLP2</b>	<i>Kinesin-like protein KIF20A y antes llamada Mitotic kinesin-like protein 2</i>
<b>MNG</b>	Bocio multinodular ( <i>Multinodular goiter</i> )
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección
<b>MPF</b>	Factor promotor de la mitosis
<b>MPS1</b>	<i>Mitotic Checkpoint Kinase</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MST2</b>	Proteína serina/treonina kinasa 3 o STK3
<b>MTC</b>	Carcinoma medular ( <i>Medullary Thyroid Carcinoma</i> )
<b>MTOC</b>	Centro organizador de microtúbulos
<b>MTT</b>	<i>Thiazolyl blue tetrazolium bromide</i>
<b>MYT1</b>	<i>Myelin transcription factor 1 kinase</i>
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NDC80-C</b>	<i>Kinetochore Complex with components: HEC1, NUF2, SPC24 y SPC25</i>
<b>ns-dsRNAi</b>	<i>Non sense double strand RNA interference</i>
<b>NEDD1</b>	<i>NEDD1 Gamma-Tubulin Ring Complex Targeting Factor</i>
<b>NEK2</b>	<i>NIMA Related Kinase 2</i>
<b>NEK6</b>	<i>NIMA Related Kinase 6</i>
<b>NEK7</b>	<i>NIMA Related Kinase 7</i>
<b>NEK9</b>	<i>NIMA Related Kinase 9</i>
<b>NER</b>	<i>Nuclear envelope reassembly</i>

<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor-κB</i>
<b>NIFTP</b>	Variante folicular encapsulada de carcinoma papilar sin invasión (“non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features”)
<b>NIR2</b>	(PITPNM1, <i>Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 1</i> )
<b>NIS</b>	Proteína del gen <i>Sodium/iodide cotransporter</i> [SLC5A5]
<b>NKX2-1</b>	Gen que expresa la proteína homeobox TTF1 (ahora llamada NKX2-1)
<b>NLP</b>	<i>Ninein-like Protein</i>
<b>NLS</b>	<i>Nuclear localization signal</i>
<b>NRAS</b>	NRAS proto-oncogen, Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
<b>NT</b>	Tiroides normal, ( <i>Normal thyroid</i> )
<b>NUDC</b>	( <i>Nuclear migration protein</i> )
<b>OD</b>	Optical density
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>oPDX</b>	Xenografts derivados de Paciente ortotópico
<b>ORR</b>	Tasa de respuesta objetiva, <i>Objective Response Rate</i>
<b>OS</b>	Supervivencia global, <i>Overall survival</i>
<b>OTC</b>	Carcinoma de células de Hürthle (oncocítico)
<b>p53BP1</b>	<i>Tumour suppressor p53-binding protein 1</i>
<b>p63</b>	Factor de transcripción p63, Tumour protein p63
<b>PACT</b>	<i>PKR activating protein</i>
<b>PAX8</b>	Factor de transcripción Paired box 8
<b>P-bodies</b>	Cuerpos de procesamiento, <i>Processing bodies</i>
<b>PBS</b>	Tampón fosfato sódico, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCD</b>	Muerte celular programada
<b>PCM</b>	Material pericentriolar
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PD</b>	<i>Progressive disease</i>
<b>PD1</b>	Receptor del ligando-1 de muerte programada
<b>PD-L1</b>	Ligando-1 de muerte programada
<b>PDTC</b>	Carcinoma pobremente diferenciado (“Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma”)
<b>PDX</b>	<i>Patient-derived Xenografts</i>
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PEI</b>	Polietilenimina
<b>PFS</b>	Supervivencia libre de progresión, <i>Progression-free survival</i>
<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-kinasa
<b>PIAS2</b>	<i>Protein Inhibitor Of Activated STAT 2</i>
<b>PIAS2a</b>	<i>Protein Inhibitor Of Activated STAT 2, alpha isoform</i>
<b>PIAS2b</b>	<i>Protein Inhibitor Of Activated STAT 2, beta isoform</i>

<b>PIK3CA</b>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-kinasa subunidad catalítica $\alpha$
<b>PKCS9</b>	Enzima proconvertasa hepática
<b>PKMYT1</b>	<i>Protein Kinase, Membrane Associated Tyrosine/Threonine 1</i>
<b>PLK1</b>	<i>Polo-like kinase 1</i>
<b>PLL</b>	Poli-L-lisina
<b>PM</b>	Prometáfase
<b>PP1</b>	<i>Protein Phosphatase 1</i>
<b>PP1<math>\gamma</math></b>	<i>Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Gamma</i>
<b>PP2A/B55</b>	<i>Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit Bbeta</i>
<b>PP2A</b>	<i>Protein Phosphatase 2</i>
<b>PP2CA</b>	<i>Protein Phosphatase 2 Catalytic Subunit Alpha</i>
<b>PP2A-B56</b>	<i>Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B'Gamma</i>
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma</i>
<b>PR</b>	Respuesta parcial, <i>Partial response</i>
<b>PRC1</b>	<i>Protein regulator of cytokinesis 1</i>
<b>PS</b>	Fosforotioato
<b>PTC</b>	Carcinoma papilar ( <i>Papillary Carcinoma</i> )
<b>qRT-PCR</b>	<i>Real-time reverse transcription-Polimerase Chain Reaction</i>
<b>Rab11</b>	<i>Ras-related protein Rab-11A (small GTPases Rab)</i>
<b>Rab35</b>	<i>Ras-related protein Rab-35 (small GTPases Rab)</i>
<b>RACGAP1</b>	<i>ac gtpase-activating protein 1</i>
<b>RAD51</b>	<i>RAD51 recombinase protein</i>
<b>RAS</b>	<i>Proto-oncogen</i>
<b>RECIST</b>	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
<b>RET</b>	Receptor tirosina-kinasa codificado en el cromosoma 10q, Rearranged during Transfection
<b>RET/PTC</b>	Reordenamiento cromosómico que genera proteínas de fusión conteniendo la parte C-terminal de RET unida con una porción N-terminal de otro gen
<b>RFP</b>	<i>Red fluorescent protein</i>
<b>RHOA</b>	<i>Ras Homolog Family Member A</i>
<b>RISC</b>	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAi</b>	RNA de interferencia
<b>RNAse H</b>	<i>Ribonuclease H</i>
<b>RNAseq</b>	<i>RNA-sequencing</i>
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteínas, <i>ribonucleoproteins</i>
<b>RR</b>	Respuesta global, <i>Response rate</i>
<b>rRNA</b>	RNA ribosomal
<b>RSS</b>	<i>Risk stratification system</i>
<b>RZZ</b>	<i>Kinetochore complex wit components; Rod, Zwilch and Zw10</i>
<b>SAC</b>	<i>Checkpoint del ensamblaje del huso, Spindle Assembly Checkpoint</i>
<b>SAV1</b>	<i>Salvador Family WW Domain Containing Protein 1</i>

<b>Scr</b>	<i>Scramble</i>
<b>SD</b>	<i>Stable disease</i>
<b>SEM</b>	Error estándar de la media, Standard Error
<b>SIM</b>	<i>SUMO interaction motif</i>
<b>siRNA</b>	RNA interferentes cortos
<b>SKA</b>	<i>Spindle and Kinetochore Associated Complex</i>
<b>SMI</b>	Moléculas pequeñas inhibidoras, <i>Small molecule inhibitor</i>
<b>SMN</b>	Proteína <i>survival motor neuron</i>
<b>SSP</b>	<i>Sample spot protein</i>
<b>STK3</b>	Proteína serina/treonina kinasa 3 o MST2
<b>STRs</b>	<i>Short Tandem Repeat</i>
<b>SUMO</b>	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
<b>T3</b>	Triyodotironina
<b>T4</b>	Hormona tiroidea tiroxina
<b>TAM</b>	Macrófagos asociados a tumores
<b>TBS</b>	Tampón Tris-Sodio, Tris buffered saline
<b>TCGA</b>	Atlas del genoma del cáncer, <i>The cancer genome atlas</i>
<b>TERT</b>	Reversotranscriptasa de telómeros, <i>Telomerase reverse transcriptase</i>
<b>TG</b>	Tioglobulina
<b>TGF beta</b>	<i>Transforming growth factor beta</i>
<b>Thr14</b>	<i>Threonine-14</i>
<b>Thr210</b>	<i>Threonine-210</i>
<b>TKIs</b>	Inhibidores tirosina kinasa
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptors</i>
<b>TP53</b>	Gen que expresa p53
<b>TPO</b>	Tiroperoxidasa
<b>TRANS</b>	Plano focal obtenido con iluminación transmitida en el microscopio confocal
<b>TRBP</b>	<i>Tat-RNA-binding protein</i>
<b>tRNA</b>	RNA de transferencia
<b>TSH</b>	Hormona estimulante de la Tiroides, Thyroid Stimulating Hormone
<b>TTF1</b>	Proteína del gen <i>Homeobox protein Nkx-2.1</i> [NKX2-1]
<b>TTF2</b>	Proteína del gen <i>Forkhead box protein E1</i> [FOXE2]
<b>TTP</b>	Tiempo transcurrido hasta la progresión, <i>Time to progression</i>
<b>TU</b>	Unidad de transducción
<b>Tyr15</b>	<i>Tyrosine-15</i>
<b>UTR</b>	<i>Untranslated region</i>
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular, <i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>VEGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
<b>VLDL</b>	<i>Very low-density lipoprotein</i>

<b>WEE1</b>	<i>Wee1-like protein kinase</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b><math>\beta</math>TrCP</b>	<i><math>\beta</math>-transducing repeat-containing protein</i>
<b><math>\gamma</math>TuRC</b>	Complejo de anillo de tubulina- $\gamma$
<b><math>\gamma</math>TuSCs</b>	Subcomplejos pequeños de la tubulina- $\gamma$



## **I. INTRODUCCIÓN**







## ***1.1 La glándula tiroides y los cánceres de tiroides***

### **I.1.1 La glándula tiroides**

La glándula tiroides es el órgano endocrino de mayor tamaño en humanos y contiene dos tipos de células endocrinas: las células foliculares y las células C (Nikiforov et al, 2012; Tallini et al, 2018). Microscópicamente, la glándula está estructurada en unidades constituidas por folículos, unas estructuras esféricas de unas 200  $\mu$ m de diámetro, delimitados por una membrana basal sobre la que descansa una capa de células foliculares. La altura de dicha capa de células foliculares varía según el estado funcional de la glándula. Los folículos están repletos de coloide, que es más abundante en los folículos inactivos y que representa una forma de almacenamiento de las pro-hormonas tiroideas en forma de tiroglobulina (Tg).

Las células foliculares son el componente epitelial principal de la glándula tiroides y las responsables de la captación de yodo para la síntesis de las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4). Las células foliculares (normales y de Hürthle) pueden identificarse mediante anticuerpos contra tiroglobulina (TG), tiroperoxidasa (TPO), TTF1 (proteína del gen “Homeobox protein Nkx-2.1” [NKX2-1]), TTF2 (proteína del gen “Forkhead box protein E1” [FOXE2], NIS (proteína del gen “Sodium/iodide cotransporter” [SLC5A5], pendrina (proteína del gen “Solute carrier family 26 member 4” [SLC26A4], T3, T4, anoctamin-1 (proteína del gen ANO1) y citoqueratinas 7 y 18 (Tallini et al, 2018).

En ocasiones (por ejemplo, en las tiroiditis) las células tiroideas foliculares tienen un citoplasma amplio eosinófilo y granular relleno de mitocondrias anormales y se denominan células de Hürthle (oncocíticas, oxifílicas o de Askanazy) (Máximo et al, 2002). Las células oncocíticas pueden ser benignas o neoplásicas y son una forma de metaplasia del epitelio folicular secundario a mutaciones del DNA nuclear o del propio DNA mitocondrial cuya naturaleza puede ser confirmada mediante inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos contra enzimas mitocondriales (Máximo et al, 2002; Tallini et al, 2018).

Las células C (células parafoliculares) de la glándula tiroides del humano adulto aparecen exclusivamente en la unión de los tercios superiores de los lóbulos laterales y son responsables de la producción de calcitonina (CT). Las células C están con frecuencia asociadas a los denominados nidos celulares sólidos, unas estructuras vestigiales del cuerpo ultimobranquial (Cameselle-Teijeiro et al, 1994; Preto et al, 2004). Las células C contienen numerosos gránulos neurosecretores que en el estudio inmunohistoquímico son reactivos para CT, pan-marcadores neuroendocrinos (cromogranina-A y sinaptofisina), katalcalcina, péptido del gen relacionado con la calcitonina, enolasa neuronal específica y el antígeno carcinoembrionario (CEA) (Nikiforov et al, 2012; Tallini et al, 2018).

### **I.1.2 Tumores de la glándula tiroides**

Los tumores tiroideos son los tumores malignos más comunes de los órganos endocrinos (Kondo et al, 2006; Acquaviva et al, 2018) y su incidencia se ha incrementado en los últimos años a razón de un 4% de incremento anual desde hace más de veinte años (Jemal et al, 2013; Lloyd et al, 2017; Kweon et al, 2018; Cronin et al, 2018; Buzzoni et al, 2019). Sin embargo, la última estadística del registro estadounidense SEER, ha mostrado por primera vez una estabilización del número de casos en el último año estudiado, 2016 (Ward et al, 2019). A pesar de ello, en población de 20-49 años sigue siendo el segundo en incidencia en mujeres (con 28,2/100.000 habitantes), y el séptimo en hombres; y en población general, es el quinto en incidencia en mujeres (con 20/100.000 habitantes) y el decimosexto en hombres (Ward et al, 2019).

La clasificación internacional de la OMS de los tumores derivados de la glándula tiroides (Lloyd et al, 2017) se representa en la Tabla I.1a. Los tumores tiroideos pueden ser primarios, de las células de la glándula tiroides, o secundarios, por metástasis desde otros órganos o por infiltración desde órganos adyacentes. Los tumores epiteliales primarios de la glándula tiroides pueden ser benignos (adenomas foliculares) y malignos. La mayoría de los nódulos tiroideos son benignos y corresponden a nódulos hiperplásicos y/o adenomas (Kondo et al, 2006). No existen tumores benignos de células C (Lloyd

et al, 2017). La mayoría de los tumores tiroideos (más del 95%) derivan de células foliculares mientras que tan solo una minoría ( $\approx 3\%$ ) denominada carcinoma medular derivan de células C (Kondo et al, 2006; Lloyd et al, 2017). La mayoría de los tumores tiroideos malignos derivan también de células foliculares, se denominan carcinomas y de acuerdo con sus características histológicas y clínicas se dividen en tres grandes grupos: a) carcinoma diferenciado (“*Differentiated Thyroid Carcinoma*”, DTC), b) carcinoma pobremente diferenciado (“*Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma*”, PDTC) y c) carcinoma indiferenciado o anaplásico (“*Undifferentiated or Anaplastic Thyroid carcinoma*”, ATC).

El *adenoma folicular* (“*Follicular Adenoma*”, FA) es una neoplasia benigna, encapsulada y no invasiva que muestra diferenciación folicular y carece de los núcleos del carcinoma papilar de tiroides (Lloyd et al, 2017). Existen diferentes subtipos histológicos pero todos ellos se caracterizan por un índice de proliferación celular bajo (típicamente un índice de Ki-67 inferior al 5%) y un comportamiento clínico benigno sin metástasis ni infiltración.

El *tumor trabecular hialinizante* es una neoplasia derivada de células foliculares compuesta de trabéculas de células elongadas o poligonales mezcladas con cantidades variables de material hialino (Lloyd et al, 2017). Se trata de un tumor controvertido en su posible relación con el carcinoma papilar, aunque la gran mayoría de estos tumores tienen un comportamiento benigno. Recientemente se ha descrito la traslocación PAX8-GLIS3 como el marcador molecular de esta neoplasia (Nikiforova et al, 2019).

La nueva clasificación de la OMS ha reconocido las dificultades que puede existir en ocasiones para el patólogo a la hora de identificar invasión capsular, angioinvasión o también para identificar las características nucleares de carcinoma papilar (Lloyd et al, 2017). Por ello, el libro de la reciente clasificación de la OMS ha incluido un nuevo capítulo sobre “otros tumores tiroideos de patrón folicular encapsulados”. De acuerdo con esta aproximación, a los tumores encapsulados o bien circunscritos de patrón folicular y dudosa invasión capsular o vascular, con independencia de la presencia o ausencia de

núcleos característicos de carcinoma papilar se les ha denominado *tumores de potencial maligno incierto*, según la terminología de los patólogos de Chernobil (Williams, 2000). Se designa como *tumor folicular de potencial maligno incierto* a aquellos tumores encapsulados o bien delimitados, células foliculares bien diferenciadas sin núcleos de carcinoma papilar y cuestionable invasión capsular o vascular. Se ha propuesto la denominación de *tumor bien diferenciado de potencial maligno incierto* a aquellos tumores encapsulados o bien delimitados compuestos de células foliculares con características nucleares de carcinoma papilar total o parcialmente desarrolladas y cuestionable angioinvasión o invasión capsular. El acrónimo de *NIFTP* (del inglés “*non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features*”) hace referencia a una neoplasia tiroidea encapsulada con patrón de crecimiento folicular y núcleos de carcinoma papilar sin invasión. El NIFTP es la nueva designación de la variante folicular encapsulada de carcinoma papilar sin invasión; supone el reconocimiento del extremadamente bajo potencial maligno de este tipo de tumor y permite evitar el estrés que la palabra cáncer suponía para los pacientes con esta neoplasia (Nikiforov et al, 2016).

El *carcinoma papilar* (“*Papillary Thyroid Carcinoma*”, PTC) es un tumor epitelial maligno con evidencia de diferenciación folicular y una serie de características nucleares. El PTC es generalmente invasivo. Su diagnóstico requiere la existencia de papilas, invasión o rasgos citológicos de PTC (Lloyd et al, 2017). Es el tipo predominante de cáncer tiroideo y el cáncer tiroideo que más se está incrementando en todo el mundo (Jemal et al, 2013; Buzzoni et al, 2019). La incidencia del PTC en las mujeres triplica a la de los hombres. Aproximadamente el 20% de los casos de PTC son multifocales. A diferencia del carcinoma folicular, el PTC tiene tendencia a diseminarse por vía linfática dando metástasis a ganglios linfáticos regionales. Son frecuentes las metástasis a los ganglios linfáticos laterales del cuello y a los de la línea media (compartimento central y niveles VI y VII). La diseminación vía hematogena es más rara y suele afectar a los pulmones. En la Tabla I.1b. se describen los subtipos histológicos de PTC indicando las variantes más agresivas. Como grupo, el PTC tiende a ser biológicamente indolente, con un excelente pronóstico, unas tasas

de supervivencia del 95% a los 5 años y una tasa de más del 90% a 20 años (Hundahl et al, 1998; Lloyd et al 2017).

El *carcinoma folicular* (“*Follicular Thyroid Carcinoma*”, FTC) es un tumor maligno de células foliculares en el cual no hay características nucleares de carcinoma papilar de tiroides. El FTC es generalmente un tumor encapsulado y muestra un crecimiento invasivo. Los tumores de células foliculares con cambio oncocítico se denominan tumores de células de Hürthle y se clasifican de forma separada del FTC (Lloyd et al, 2017). El FTC incluye tres subtipos histológicos que se asocian a progresiva agresividad clínica: a) el FTC mínimamente invasivo, caracterizado por la presencia exclusiva de invasión capsular, b) el FTC encapsulado angioinvasivo, y c) el FTC ampliamente invasivo. Los FTCs con solo invasión capsular tienen un pronóstico excelente, pero cuanto mayor es el número de vasos invadidos por el tumor el pronóstico es peor (O'Neill et al, 2011). Los sitios de metastatización más comunes son hueso, pulmones, cerebro e hígado (Zhao et al, 2016), aunque no son raras las metástasis a la dermis cutánea (Nixon et al, 2012). Dado que los FTCs son tumores bien diferenciados, suele haber respuesta al tratamiento con yodo radiactivo y largas supervivencias (Lloyd et al, 2017).

La mutación del promotor del gen TERT ha resultado ser un marcador independiente de mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad y de mortalidad asociada al cáncer tiroideo diferenciado (PTC y FTC) (Melo et al, 2014; Liu and Xing, 2016).

Los *tumores de células de Hürthle* (*oncocíticos u oxifílicos*) son neoplasias (generalmente encapsuladas) constituidas por células oncocíticas. Los casos no invasivos se denominan adenomas de células de Hürthle y los casos con invasión capsular y/o vascular carcinoma de células de Hürthle (“*Hürthle cell carcinoma*”, HCC) (Lloyd et al, 2017). Estos carcinomas se clasifican en subtipos de forma análoga al FTC, es decir: a) HCC mínimamente invasivo, b) HCC encapsulado angioinvasivo, y c) HCC ampliamente invasivo. El pronóstico del HCC está relacionado con el número de vasos invadidos. Los HCC ampliamente invasivos con marcada angioinvasión se asocian con elevada mortalidad (más del 90% a 10 años) (Chindris et al, 2015). La

acumulación de mutaciones en las vías PIK3CA-AKT-mTOR y WNT/ $\beta$ -catenina se ha asociado a HCC con fenotipo clínico agresivo (Ganly et al, 2013). Debido a que los tumores de células de Hürthle son resistentes al yodo radiactivo (Chindris et al, 2015), las opciones de tratamiento son más limitadas que para los PTCs y FTCs no oncocíticos. La supervivencia global para los HCC varía desde el 85% para los HCC mínimamente invasivos hasta alrededor del 10% para los HCC ampliamente invasivos (Ganly et al, 2013; Chindris et al, 2015). Los tumores pobremente diferenciados de células oncocíticas tienen peor pronóstico (véase más adelante). Algunos HCC pueden experimentar transformación anaplásica en el momento del diagnóstico inicial o tras sucesivas recurrencias (Lloyd et al, 2017).

El *carcinoma pobremente diferenciado* de tiroides (“*Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma*”, PDTC) es una neoplasia de células foliculares que muestra limitada evidencia de diferenciación folicular y que tanto morfológicamente como desde el punto de vista del comportamiento biológico es intermedio entre los carcinomas diferenciados (papilar y folicular) y el carcinoma anaplásico (Lloyd et al, 2017). Los criterios histopatológicos diagnósticos del PDTC son los del llamado consenso de Turín (Volante et al, 2007). Este consenso incluye un algoritmo diagnóstico basado en los siguientes criterios para el diagnóstico de PDTC: 1) presencia de patrón de crecimiento sólido/trabecular/insular, 2) ausencia de núcleos con características convencionales de carcinoma papilar de tiroides, y 3) presencia de al menos alguno de los siguientes datos: núcleos convolutos, 3 o más figuras de mitosis por 10 campos de 400 aumentos y necrosis tumoral. Estos criterios han sido validados en series más recientes (Asioli et al, 2010; Gnemmi et al, 2014; Yu et al 2017). Se ha evidenciado que la presencia de un 10 % de áreas con criterios de PDTC en un carcinoma bien diferenciado ya se asocia a peor pronóstico (Dettmer et al, 2011). Además, los criterios de PDTC también son aplicables a los HCC (Dettmer et al, 2012; Bai et al, 2015) y a la variante cribiforme-morular de carcinoma papilar (Cameselle-Teijeiro et al, 2018).

Las alteraciones moleculares asociadas al PDTC incluyen eventos “driver” precoces típicamente asociados a carcinomas bien diferenciados (por ejemplo, en RAS y BRAF) así como otras



alteraciones que ocurren como eventos finales asociados a dediferenciación (por ejemplo, mutaciones en TP53, TERT, CTNNB1 y AKT1) (Soares et al, 2011; Tavares et al, 2016; Landa et al, 2016; Lloyd et al, 2017). La carga mutacional del PDTC es intermedia entre el carcinoma papilar bien diferenciado y el carcinoma anaplásico (Landa et al, 2016). La supervivencia global del PDTC a 5 años oscila entre el 60-70% (Sobrinho-Simões et al, 2002; Garcia-Rostan et al, 2003; Volante et al, 2007; Asioli et al, 2010; Ibrahimpasic et al, 2014). Las recurrencias suelen desarrollarse dentro de los 3 primeros años (Carcangiu et al, 1984; Hiltzik et al, 2006; Gnemmi et al, 2014). El tiempo medio de supervivencia del PDTC es de unos 5 años tras el diagnóstico (Volante et al, 2007). El PDTC tiene generalmente una pobre respuesta al tratamiento con yodo radiactivo (Carcangiu et al, 1984; Rivera et al, 2008; Ibrahimpasic et al, 2014).

El *carcinoma anaplásico* (“*Anaplastic Thyroid Carcinoma*”, ATC) de tiroides es un tumor maligno de la glándula tiroides compuesto por células foliculares tiroideas altamente indiferenciadas (Lloyd et al, 2017). El ATC, también denominado carcinoma tiroideo indiferenciado, es el tumor maligno primario tiroideo más agresivo, con una supervivencia media de solo el 10-20% en el primer año (Kebebew et al, 2005; Brignardello et al, 2007; Cornett et al, 2007; Jemal et al, 2008; Smallridge et al, 2010). Aunque está aumentando el número de pacientes con más de un año de vida, a pesar de las terapias agresivas la supervivencia media del ATC no ha mejorado significativamente en los últimos 20 años (Salehian et al, 2019). Los pacientes suelen ser de edad avanzada y el tumor suele presentarse clínicamente como una masa en el cuello que crece rápidamente e infiltra las estructuras del cuello causando dolor, ronquera, disnea y/o disfagia. Aproximadamente el 35% de los pacientes tienen metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (Lloyd et al, 2017).

Macroscópicamente los tumores son grandes e infiltrantes, carnosos y con zonas de hemorragia y necrosis. Histológicamente la morfología es variable, aunque puede agruparse en tres patrones morfológicos principales (solos o en combinación): patrón sarcomatoide, patrón de células gigantes y patrón epitelial (Lloyd et al, 2017). El ATC sarcomatoide está formado por células fusiformes con características

similares a las que se ven en el sarcoma pleomorfo de alto grado. El ATC de células gigantes contiene células malignas pleomórficas que en ocasiones son multinucleadas. El ATC epitelial se presenta con nidos cohesivos de células escamosas o escamoides y ocasionales focos de queratinización. En todos los casos es frecuente la necrosis, elevada actividad mitótica, un crecimiento muy infiltrativo e invasión vascular. Es también común la presencia de infiltrado inflamatorio agudo, macrófagos infiltrando el tumor, presencia de elementos heterólogos (por ejemplo, cartílago y/o hueso neoplásico) y/o células gigantes multinucleadas de tipo osteoclástico (Lloyd et al, 2017). A diferencia del ATC, el carcinoma tiroideo escamoso muestra diferenciación escamosa en la totalidad de sus células. Existen también raras variantes de ATC de tipo paucicelular, angiomatoide, rabdoide, linfocitelioma y de célula pequeña (Lloyd et al, 2017). En el estudio inmunohistoquímico de ATC, a diferencia de lo que ocurre en los DTC (papilar y folicular) y en el PDTC las células tumorales son negativas para tiroglobulina y TTF1, mientras que PAX8 y FoxA1 suele ser positivo en el 50% de los casos de ATC (Nonaka et al, 2008; Bishop et al, 2011; Nonaka, 2017).

Debido a que los ATC encontrados incidentalmente en piezas de tiroidectomía por carcinoma diferenciado pueden tener mejor curso clínico, debe indicarse siempre en el informe anatomopatológico el porcentaje de ATC (Brignardello et al, 2007; Cornett et al, 2007; Yoshida et al, 2014). Aunque la mayoría de los casos de ATC son irresecables en el momento de la presentación, algunos pacientes pueden beneficiarse de cirugía agresiva con radioterapia y/o quimioterapia adyuvante (Kebebew et al, 2005; Sugitani et al, 2014). Hay también numerosos ensayos en marcha con nuevas terapias dirigidas y/o inmunoterapia contra el ATC (Ferrari et al, 2018; Saini et al 2018, Cantara et al, 2019; Takahashi et al, 2019).

El *carcinoma medular* (“*Medullary Thyroid Carcinoma*”, MTC) es un tumor tiroideo maligno compuesto de células con evidencia de diferenciación de células C. Otros tipos de tumores tiroideos primarios derivados de células foliculares como el *carcinoma mucoepidermoide*, el *carcinoma mucoepidermoide esclerosante con eosinofilia* y el *carcinoma mucinoso* son muy infrecuentes. El



*carcinoma mixto medular y folicular* muestra datos morfológicos e inmunofenotípicos de la coexistencia de poblaciones tumorales derivadas de células foliculares y de células C, pero es un tumor extremadamente raro (Lloyd et al, 2017).

**Tabla I.1a. Clasificación de la OMS de los tumores tiroideos.**

Adenoma folicular	Timoma ectópico
Tumor trabecular hialinizante	Tumor epitelial fusiforme con diferenciación de tipo tímica
Otros tumores tiroideos encapsulados de patrón folicular	Carcinoma tímico intratiroideo
- Tumor folicular de potencial maligno incierto	Paraganglioma y tumores mesenquimales /estromales
- Tumor bien diferenciado de potencial maligno incierto	- Paraganglioma
- Neoplasia tiroidea folicular no invasiva con rasgos nucleares de tipo papilar	- Tumor de vaina nerviosa periférica (shwannoma), tumor maligno de vaina nerviosa periférica
Carcinoma papilar (CP)	- Tumores vasculares benignos (hemangioma, hemangioma cavernoso, linfangioma)
Carcinoma folicular (CF)	- Angiosarcoma
- CF mínimamente invasivo	- Tumores de músculo liso (leiomioma, leiomiosarcoma)
- CF encapsulado angioinvasivo	- Tumor fibroso solitario
- CF ampliamente invasivo	Tumores hematolinfoides
Tumores de células de Hürthle (oncocíticos)	- Histiocitosis de células de Langerhans, Enfermedad de Rosai-Dorfman, sarcoma de células foliculares dendríticas, linfoma primario)
- Adenoma de células de Hürthle	Tumores de células germinales
- Carcinoma de células de Hürthle	- Teratoma benigno (grado 0 o 1)
Carcinoma pobremente diferenciado	- Teratoma inmaduro (grado 2)
Carcinoma anaplásico (indiferenciado)	- Teratoma maligno (grado 3)
Carcinoma escamoso	Tumores secundarios
Carcinoma medular	
Carcinoma mixto medular y folicular	
Carcinoma mucoepidermoide	
Carcinoma mucoepidermoide esclerosante con eosinofilia	
Carcinoma mucinoso	

Modificado a partir del libro de la clasificación de tumores tiroideos de la OMS (Lloyd et al 2017). Permitido por IARC

**Tabla I.2b. Variantes de carcinoma papilar de tiroides.**

Microcarcinoma papilar
CP, variante encapsulada
CP, variante folicular (macrofolicular, <i>difusa/multinodular</i> )
CP, variante esclerosante <i>difusa</i>
CP, variante de células altas
CP, variante columnar
CP, variante cribiforme-morular
CP, variante "hobnail"/micropapilar
CP, variante con estroma tipo fibromatosis/tipo fascitis
CP, variante <i>sólida/trabecular</i>
CP, variante oncocítica
CP, variante de células fusiformes
CP, variante de células claras
CP, variante de tipo Warthin

Modificado a partir del libro de la clasificación de tumores tiroideos de la OMS (Lloyd et al 2017). En cursiva se indican las variantes más agresivas del CP. Permitido por IARC

## ***1.2 Tratamientos del Cáncer de Tiroides***

Como se ha explicado en la anterior sección, la mayoría de los cánceres de tiroides son DTC, cerca de 85% son PTC y 5% son FTC. Los DTC mantienen el fenotipo de la célula folicular normal de tiroides y son bien manejados por los endocrinólogos que indican cirugía y medicina nuclear (yodo radioactivo). Un pequeño porcentaje (5%) de los DTC evolucionan a PDTC manteniendo algunas características del fenotipo de tiroides, pero perdiendo la capacidad para captar yodo. Y por último, hay un 1-5% de los cánceres de epitelio folicular de tiroides que pierden el fenotipo tiroideo, son los ATC (Smallridge et al, 2010).

### **1.2.1 Tratamiento del Carcinoma Diferenciado de Tiroides**

El DTC deriva del epitelio folicular de la tiroides y conserva características del fenotipo de la tiroides normal. Como siguen manteniendo NIS estos carcinomas siguen captando yodo. El enfoque terapéutico, para este tipo de cáncer incluye la cirugía y la ablación en caso de que haya remanentes con yodo 131 radiactivo (Schmidbauer et al, 2017). Con estos tratamientos la mayoría de los pacientes con DTC tienen un excelente pronóstico.

Sin embargo, un subgrupo de pacientes (menos del 10%) presentará metástasis a distancia o recurrirá bien por recrecimiento o por metástasis; y de estos dos tercios de ellos se volverán refractarios al tratamiento con yodo radiactivo (Schlumberger et al, 2014; Cabanillas et al, 2019).

#### I.2.1.1 Cirugía

La tiroidectomía total es el tratamiento de elección para los DTC primarios que miden entre 1 a 4 cm. La tiroidectomía sin disección profiláctica de los ganglios centrales del cuello puede ser elegida para carcinomas papilares de tiroides no invasivos y sin metástasis en ganglios del estadio tumoral T1 (tamaño del tumor  $\leq 2$  cm e intratiroideo) o T2 (tamaño del tumor  $> 2$  cm y  $\leq 4$  cm e intratiroideo) y para la mayoría de los carcinomas foliculares de tiroides. Los compartimientos de ganglios linfáticos clínicamente involucrados deben resecarse. La tiroidectomía total con resección de los compartimientos de ganglios linfáticos afectados es el tratamiento recomendado para los tumores que miden más de 4 cm (Fagin and Wells, 2016).

Un poco diferentes es el grupo de “microcarcinomas” o tumores  $< 1$  cm de diámetro. En los estudios de vigilancia prolongada muestran que la mayoría de los microcarcinomas papilares, PTC  $< 1$  cm según la clasificación de la *World Health Organization (WHO)* no progresan. Así, en casos seleccionados la cirugía se puede evitar o diferir (Oda et al, 2016). En la actualidad se propone una actitud expectante, “*active surveillance*”, para aquellos carcinomas sin criterios de malignidad, con vigilancia periódica por ultrasonidos y Tg (Sugitani et al, 2019; Kong et al, 2019).

Por ahora es un tema en debate, ya que no hay un acuerdo absoluto sobre en qué casos de microcarcinoma sería conveniente hacer vigilancia.

Las guías clínicas de la ATA proponen un grupo de variables para identificar los pacientes según su riesgo de recurrencia de la enfermedad, la llamada RSS (por *Risk Stratification System*) (Haugen et al, 2016):

- Grupo de alto riesgo: extensión extratiroidea amplia, resección incompleta del tumor, metástasis distantes o nódulos linfáticos > 3 cm;
- Grupo de riesgo intermedio: histología agresiva, extensión extratiroidea menor, invasión vascular o con nódulos linfáticos > 5 (0,2 a 3 cm);
- Grupo bajo riesgo: DTC intratiroidea, ganglios linfáticos micro metastásicos menores que  $\leq 5$  (<0,2 cm).

Entre estas variables, se ha añadido algún marcador molecular. como BRAFV600E que eleva de categoría bajo riesgo a riesgo intermedio los cánceres <4 cm (Haugen et al, 2016). El papel de RAS es discutible, ya que, aunque está en presente en carcinoma, también aparece mutado en aminoácidos similares en adenomas foliculares (Schmidbauer et al, 2017). En los últimos años, además de BRAF se proponen nuevos biomarcadores moleculares genéticos como mutaciones en fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-kinasa subunidad catalítica  $\alpha$  (PIK3CA), p53 (TP53), RAC- $\alpha$  serina/treonina-proteína kinasa 1 (AKT1) y la mutación en el promotor de la reversotranscriptasa de telómeros (TERT promoter). Ninguno de estos marcadores se emplea de momento en la clínica cotidiana con suficiente confianza en su especificidad y sensibilidad para predecir el riesgo de recurrencia (Schmidbauer et al, 2017).

Entre los pacientes con carcinomas papilares de tiroides con mutaciones conjuntas de BRAFV600E y TERT, la supervivencia es notoriamente más corta que entre aquellos con mutaciones BRAFV600E solo (Fagin and Wells, 2016).

### I.2.1.2 Terapia con yodo radiactivo

La terapia con yodo radiactivo se basa en que las células foliculares tiroideas de los carcinomas diferenciados de tiroides mantienen la capacidad de transportar e incorporar yoduro en la tiroglobulina. Y se define como la administración sistémica de  $I^{131}$  (radioyodo como yoduro de sodio o yoduro de potasio) para irradiar los restos de tiroides tras una cirugía, así como aquellos DTC no resecables o resecados de forma incompleta, o las metástasis no resecables (Schmidbauer et al, 2017).

Hasta hace poco tiempo, la mayoría de los pacientes con carcinoma diferenciado de tiroides tras la cirugía se trataban con yodo radiactivo a pesar de la falta de datos de ensayos clínicos para apoyar la práctica. Ahora el tratamiento después de la cirugía depende del estadio de carcinoma.

La terapia con yodo radiactivo ya no se recomienda en pacientes con cáncer de tiroides de bajo riesgo, estadios T1 y T2, porque la tasa de recurrencia y la mortalidad son bajas y los estudios no han mostrado mejor pronóstico (Hay et al, 2008; Schvartz et al, 2012). Los datos sobre la terapia con yodo radiactivo en pacientes con enfermedad de riesgo intermedio no son tan convincentes (Fagin and Wells, 2016).

Para cáncer persistente no hay duda en que se tiene que administrar tratamiento con yodo radiactivo, como en los tumores T3 o T4, o los carcinomas que se han diseminado a los ganglios linfáticos o áreas distantes. Sobre todo, en los pacientes que tienen elevados niveles de tiroglobulina después de la cirugía (Haugen et al, 2016).

Los pacientes sometidos a tiroidectomía necesitarán tomar diariamente pastillas de hormona tiroidea (levotiroxina). Pero en caso de que tengan que ser sometidas a tratamiento radioactivo el tratamiento de hormonas de sustitución deberá ser retrasado hasta que el tratamiento con yodo radiactivo termine (normalmente entre 6 a 12 semanas después de la cirugía).

Recientemente se ha establecido una clasificación para evaluar la respuesta al yodo radioactivo en los pacientes, llamada *Dynamic Risk Stratification* (DRS) (Ozkan et al, 2017). Se tienen en cuenta los niveles de Tg tras la cirugía frente a los niveles de Tg después del yodo radioactivo, que deben ser muy bajos, y las pruebas de imagen (ecografía, rastreo, TAC o PET-TAC); si hay anticuerpos anti-Tg se toman estos en consideración. La DRS resulta en cuatro categorías: respuesta Excelente (no hay rastros en imagen y Tg baja), respuesta estructural incompleta (hay positividad en imagen, independientemente de la Tg), respuesta bioquímica incompleta (no hay rastros en imagen, pero la Tg se mantiene alta o sube), respuesta indeterminada (las pruebas de imagen no son concluyentes; el lecho tiroideo mantiene captación; la Tg está en valores por encima de los admitidos; hay anticuerpos anti-Tg estables).

Según las recomendaciones de la ATA 2015 la TSH sérica debe mantenerse suprimida durante los siguientes cinco años, en niveles entre 0,1 y 0,5 mU/L mediante altas dosis de tiroxina en pacientes con enfermedad de alto riesgo, pero con una respuesta excelente o intermedia al tratamiento y también en pacientes con una respuesta bioquímica incompleta que tenga en cuenta la clasificación RSS inicial de riesgo. Si la DRS es excelente en pacientes con bajo riesgo de recurrencia y no hay evidencia de enfermedad en el transcurso del tiempo, el nivel sérico de TSH puede mantenerse en un rango de 0,5 a 2,0 mU/L. porque no hay datos que muestren un beneficio de la supresión de la TSH en pacientes de bajo riesgo (Haugen et al, 2016). Más recientemente se han publicado discrepancias entre expertos europeos y las recomendaciones de la ATA 2015 en relación con el manejo del carcinoma tiroideo diferenciado (Luster et al, 2019).

### I.2.1.3 Cáncer avanzado de tiroides

El tratamiento del cáncer que recurre después de un tratamiento inicial depende principalmente de si el cáncer recurre/ recidiva en el sitio o si aparece una metástasis, aunque otros factores también pueden ser importantes (Cabanillas et al, 2019).

Si el cáncer recidiva en el cuello, se realiza una biopsia guiada por ecografía para confirmar que se trata de cáncer de tiroides. Si el tumor parece ser resecable se realiza cirugía. Si el cáncer es positivo en un rastreo con yodo radioactivo (lo que significa que las células están absorbiendo yodo), se puede usar la terapia con yodo radioactivo (RAI), ya sea solo o con cirugía. (Cabanillas et al, 2019, Luster et al, 2019)

Sin embargo, en pacientes con carcinoma de tiroides refractario a radioyodo primario (más común en el PDTC) o secundario (por ejemplo, un DTC que recurre), el pronóstico empeora significativamente, aunque no todos van a ser progresivos inmediatamente ya que algunos casos, incluyendo cánceres de tiroides avanzados metastásicos, se comportan de forma indolente y son asintomáticos (Cabanillas et al, 2019).

La terapia sistémica suele ser usada en pacientes con metástasis refractarias a yodo que están progresando y que no son susceptibles de recibir terapias localizadas. La radioterapia paliativa, solo o junto con quimioterapia de dosis bajas, o terapias locales pueden controlar metástasis locales o no resecables. El tratamiento con bifosfonatos o un activador anti-receptor del ligando del factor nuclear- $\kappa$ B (RANK) puede beneficiar a los pacientes con metástasis óseas, aunque la eficacia de los compuestos no se ha probado en ensayos prospectivos (Fagin and Wells, 2016; Cabanillas et al, 2019).

Los inhibidores tirosina kinasa (TKIs) han mostrado efectividad clínica en el DTC refractario al yodo (Cabanillas et al, 2019). También se les llama inhibidores multikinasa (MKI). Los TKIs se unen e inhiben a distintos receptores kinasa y kinasas citoplasmáticas con diferente afinidad, pero comparten el mismo mecanismo de acción: inhibición competitiva del sitio de unión del ATP en el dominio catalítico del receptor o de la kinasa, bloqueando de esta manera las cascadas de señalización intracelular. La mayoría actúa sobre VEGFR, bloqueando principalmente la angiogénesis tumoral (Schmidt et al, 2017). Los dos inhibidores multikinasa aprobados por la FDA y EMA para cáncer de tiroides son el Sorafenib y el Lenvatinib tras los dos ensayos clínicos clave DECISION y SELECT (Brose et al, 2014; Schlumberger et al, 2015; Cabanillas et al, 2019). Pero hay varios más en estudio (Sunitib,

Vandetanib, Cabozantinib, Vemurafenib, Dabrafenib, Axitinib, Pazopanib, Everolimus, Dovitinib, Anlotinib, Larotrectinib) (Cabanillas et al, 2019).

Estos fármacos mantienen estable la enfermedad, pero hasta el momento no han demostrado prolongar la supervivencia y solo ocasionalmente se consiguen respuestas completas, en parte debido a que se permitió en los ensayos clínicos cruzar del brazo placebo al tratado (Cabanillas et al, 2019). En un análisis de subgrupos de edad, en pacientes >65 años tratados desde el inicio con Lenvatinib sí que se demostró aumento de la supervivencia global (OS) (Cabanillas et al, 2019). Los TKIs se reservan para aquellos pacientes en los que se evidencie progresión, en los que se sospeche que la progresión determinará rápidamente la aparición de síntomas y/o en aquellos pacientes con enfermedad avanzada que presenten síntomas no susceptibles de tratamiento local (Schmidt et al, 2017).

Hay también otro inhibidor en fase II, el Vemurafenib, que inhibe BRAF con alta eficiencia (Brose et al, 2016). Los pacientes con melanoma mutado BRAFV600E tienen una alta tasa de respuesta al Vemurafenib (Chapman et al, 2011; Tiaacci et al, 2015), mientras que en líneas celulares de cáncer tiroideo mutado con BRAF y carcinomas papilares tiroideos papilares asociados a BRAF son refractarios al Vemurafenib mediante la activación de señalización del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3). En consecuencia, la tasa de respuesta entre los pacientes con carcinoma papilar de tiroides mutado con BRAF en un ensayo de fase II de Vemurafenib fue del 38.5%, que es considerablemente menor que entre los pacientes con melanoma (Brose et al, 2016).

Actualmente se están desarrollando ensayos de combinación con inhibidores de BRAF y MEK, así como inhibidores de BRAF y HER3. Existe un ensayo clínico en Fase II con la combinación de inhibidores BRAF y MEK, donde se usa el Dabrafenib (Inhibidor de BRAF) con o sin Trametinib (Inhibidor de MEK) en pacientes con PTC refractario al yodo y con BRAF mutado. Las terapias con Dabrafenib solo o combinado con el Trametinib han sido bien toleradas con tasas de respuestas duraderas en los pacientes con PTC con mutación de



BRAF (Shah et al, 2017). Sin embargo, uno de los pacientes que tuvo una respuesta excelente al tratamiento con los inhibidores de BRAF y MEK pero desarrolló un mecanismo de resistencia producido porque había desarrollado una mutación KRAS G12V. Posteriormente, el paciente recibió tratamiento con Cabozantinib y obtuvo una respuesta parcial (PR), con una reducción del 45% (Owen et al, 2019). Esto puede sugerir que AKT y ERK son buenas dianas terapéuticas como se ha demostrado en otros estudios clínicos (Cabanillas et al, 2017). Para la combinación de inhibidores BRAF y HER3 hay un ensayo clínico en fase I que combinan Dabrafenib (inhibidor de BRAF) y Lapatinib (inhibidor de HER2/HER3). La combinación de Dabrafenib y Lapatinib demostró ser segura y bien tolerada (Sherman et al, 2018).

## **I.2.2 Carcinoma anaplásico de tiroides**

Los ATC son tumores muy raros (1-2 casos/millón /año) y que representan un pequeño subconjunto del cáncer de tiroides, dependiendo de las series 2% o 5% y alguna hasta el 9,8% de los cánceres de tiroides (Davies et al, 2006; Tuttle and Sherman, 2019). La edad media de incidencia es mayor que en el DTC, y está en 65 años y la mayoría, 50%-70%, mujeres (Kebebew et al, 2005; Tuttle and Sherman, 2019). Este tipo de cáncer es muy agresivo. El cáncer invade localmente y mata al paciente en unos pocos meses (media de supervivencia 6 meses), con una supervivencia de 20-30% al año y 5-14% en cinco años, casos que se interpreta por muchos que estaban mal diagnosticados (Zivaljevic et al, 2014; Tuttle and Sherman, 2019). La mortalidad específica es 100% (Zivaljevic et al, 2014; Tuttle and Sherman, 2019). Este cáncer crece incontrolablemente de forma muy rápida con dolor de cuello, invasión por compresión del tracto digestivo o respiratorio, y presenta metástasis a distancia en el 50% de los pacientes (Nagaiah et al, 2011; Tuttle and Sherman, 2019).

Los ATC se clasifican siempre como estadio IV, aunque en la clasificación del American Joint Cancer Committee (AJCC) más reciente del 2018 se emplean la misma clasificación para T que para el resto de los cánceres de tiroides (Perrier et al, 2018). El estadio IVA son ATC intratiroides de T1-T3a y N0 (sin metástasis en los ganglios

linfáticos locales) o Nx, M0 (sin metástasis a distancia). En el estadio IVB, el tumor primario tiene una extensión extratiroidea amplia de T1-T3a con al menos N1, o T3b-T4 con cualquier N. Los pacientes en estadio IVC tienen cualquier T pero con metástasis a distancia M1 (Tuttle et al, 2017a; Tuttle et al, 2017b; Perrier et al, 2018).

Un 20-30% de los pacientes con ATC presentan en coexistencia un DTC (Moore et al, 1985; Tuttle and Sherman, 2019). Por otra parte, otro 20% de los pacientes con ATC tienen como antecedente previo un DTC (Moore et al, 1985; Tuttle and Sherman, 2019). Estos dos hechos hicieron que, en 2009, el grupo de Fagin propuso que los carcinomas anaplásicos de tiroides se originaban a partir de un DTC (Ricarte-Fillo JC et al, 2009). Recientemente, nuestro grupo aplicando secuenciación masiva (*next-generation sequencing*) en una serie de carcinomas anaplásicos alguno de los cuales coexistía con PTC obtuvo varios datos interesantes que contravienen esta hipótesis. En primer lugar, la variación genética entre los PTC y los ATC de los mismos pacientes era tal, que en caso de derivar del mismo cáncer original habían divergido muy temprano y cada uno seguido su propia evolución genética (Capdevila et al, 2018). La siguiente observación muy interesante es que, aunque no había grupos de mutaciones comunes a todos los casos de ATC a excepción de las ya conocidas como p53 o TERT promotor, cada caso tenía un porcentaje muy alto de células que compartían las mismas mutaciones (Landa et al, 2016; Capdevila et al, 2018; Pozdeyev et al, 2018). Este hecho no pasa en otros cánceres, cuya heterogeneidad es bien conocida, y sugiere que una terapia dirigida a un ATC sí que puede ser efectiva.

Este tipo de carcinoma es muy difícil de manejar ya que no responde a la terapia convencional (Livhits and Yeh, 2017) ni a la cirugía, radioterapia, quimioterapia (incluyendo los TKIs) ni a ninguna combinación entre ellos, (Iñiguez-Ariza et al, 2017; Ito et al, 2017). Debido al fenotipo indiferenciado del ATC y la ausencia del transportador NIS, el tratamiento con yodo radiactivo no es efectivo. Para el tratamiento del ATC, se emplea un enfoque terapéutico multimodal que incluye resección quirúrgica, radioterapia hiper

fraccionada, seguida de una combinación de quimioterápicos y/o cuidados paliativos (Fagin and Wells, 2016).

Según las “*guidelines*” de la ATA, el tratamiento para los casos tipo IVA y IVB incluye la resección quirúrgica, si es posible, y la radioterapia para el control local (con o sin terapia sistémica). Las opciones de manejo de seguimiento dependen de si el paciente no tiene evidencia de enfermedad o recurrencia local, o progresa hacia una enfermedad sistémica. Los pacientes con ATC que se presentan con enfermedad local confinada pero no resecable deben considerar la radioterapia paliativa con o sin terapia sistémica. Debido a la rapidez con que se desarrolla y la agresividad de la enfermedad el tratamiento con radioterapia hipofraccionada es el más indicado (Kwon et al, 2016). Posteriormente, algunos tumores pueden hacerse resecables. Las opciones de terapia de seguimiento dependen de las respuestas del paciente a la terapia inicial. En el caso de estadios tipo IVC, los pacientes que presentan metástasis a distancia deben decidir si seguir una terapia agresiva o directamente procedimientos paliativos (Smallridge et al, 2012).

Actualmente hay varios fármacos disponibles comercialmente estudiados en el tratamiento del cáncer de tiroides.

Recientemente, para los tumores con mutación positiva BRAFV600E, una combinación de Dabrafenib (inhibidor de BRAF) más Trametinib (inhibidor de MEK) en el ensayo clínico NCT02034110 con 16 pacientes al inicio que ha incorporado ya hasta 28 pacientes ha mostrado respuestas clínicas. La tasa de respuesta global (RR) fue del 69% (11 de 16; IC del 95%, 41% a 89%). Las estimaciones para la duración media de la respuesta (DOR) a 12 meses, la supervivencia libre de progresión (PFS) y la supervivencia global (OS) fueron del 90%, 79% y 80%, respectivamente. (Subbiah et al, 2018). Antes del tratamiento, todos los pacientes recibieron cirugía o radioterapia, aunque para entrar en este ensayo clínico se exigía estar en muy buenas condiciones con respecto a la deglución y estado físico y esto podría haber sesgado los resultados (Cabanillas et al, 2019). En 2018, presentaron una actualización de los datos y de 28 pacientes incorporados al ensayo 18 seguían vivos con una supervivencia global

(OS) de 1,7 años (Subbiah et al, 2018). Hasta ahora, este es el primer ensayo clínico que mostró una alta respuesta clínica para esta enfermedad y esto conllevó su aprobación como primera línea en ATC BRAFV600E por la FDA. El problema es que solo el 10% (en algunas series más pequeñas el 50%) de los ATC son positivos para BRAFV600E (Lloyd et al, 2017).

Aunque BRAF y RAS se consideren los “drivers” más frecuentes los ATC se caracterizan por mutaciones frecuentes en TP53, el promotor TERT, los efectores de la ruta del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) -AKT-diana de la rapamicina en células de mamífero (mTOR) y los genes involucrados en la regulación epigenética, donde están incluidos los componentes del complejo SWI / SNF y la histona metiltransferasa (Landa et al, 2016; revisado en Cabanillas et al, 2019). Los tratamientos de segunda línea incluyen terapias más dirigidas, como los inhibidores de la tirosina quinasa, los fármacos antiangiogénicos y los agonistas e inhibidores de la multikinasa dirigidos a BRAF, mTOR y/o BCR-ABL.

La señalización de RAF/MAPK es parte integral de la progresión de ATC y algunas de las terapias moleculares que incluyen el inhibidor de BRAF (Vemurafenib / PLX4032) y el inhibidor de MEK (Selumetinib / AZD6244) se dirigen a esta vía de señalización. En general, estos inhibidores de una sola diana no mostraron respuestas terapéuticas significativas en pacientes con ATC, lo que llevó al uso de inhibidores de múltiples kinasas (TKIs). Los TKIs pueden actuar simultáneamente en dos o más dianas. Los TKIs como Sorafenib, Axitinib y Pazopanib, se han evaluado en modelos preclínicos, así como en ensayos clínicos (Saini et al, 2018; revisado en Cabanillas et al, 2019).

Sorafenib demostró una supervivencia libre de progresión (PFS) de aproximadamente cinco meses en un ensayo clínico de fase III con pacientes que presentan toxicidades manejables en comparación con el grupo placebo. Sin embargo, la mayoría de los pacientes experimentaron una recaída de la enfermedad, lo que indica la necesidad de una combinación de MKI para mejorar los resultados (Saini et al, 2018; revisado en Cabanillas et al, 2019).

El Axitinib es un potente inhibidor antiangiogénico de los receptores VEGFR1-3 y está aprobado para el tratamiento del carcinoma de riñón. En la fase II entraron 2 casos de ATC que han tenido una respuesta parcial de 30% (Cohen et al, 2008; revisado en Cabanillas et al, 2019).

El Everolimus es un inhibidor kinasa de mTOR y está aprobado por la FDA para el tratamiento del carcinoma de riñón. Se han hecho varios estudios en ATC. En el primero, de 6 ATC uno de ellos tuvo una reducción tumoral significativa de 21% (Schneider et al, 2017; revisado en Cabanillas et al, 2019). El estudio más reciente con el Everolimus en fase II entran 7 pacientes con ATC. En los resultados se han observado una respuesta parcial en los cortes histológicos de los casos ATC con mutación TSC2 (Wagle et al, 2014; revisado en Cabanillas et al, 2019).

Otro TKI, el Lenvatinib fue usado en pacientes ATC. En estos pacientes tratados con Lenvatinib se observaron respuestas parciales (PR) en el 60% (3/5) de los pacientes, mientras que el 40% (2/5) experimentó una enfermedad estable con una toxicidad manejable. Además, la tasa de respuesta objetiva (ORR) observada fue del 60%, con una mediana de tiempo transcurrido hasta la progresión (TTP) de 88 días y de supervivencia global (OS) de 165 días (Koyama et al, 2018).

Otros tratamientos prometedores son los inhibidores de Aurora Kinasa, una kinasa implicada en procesos de mitosis como la separación y maduración del centrosoma, la entrada mitótica celular y la construcción del huso bipolar y que está muy sobreexpresada en ATC. (Baldini et al, 2014). Una combinación de MLN8054 (inhibidor de Aurora kinasa) con Bortezomib (inhibidor de proteasoma) indujo apoptosis y parada del ciclo celular en líneas celulares de ATC (Wunderlich et al, 2012). Otro inhibidor de la Aurora kinasa, el Pazopanib, mostró citotoxicidad en combinación con Paclitaxel en estudios *in vitro* usando líneas celulares de carcinomas anaplásicos de tiroides e *in vivo* usando xenografts y un paciente con ATC (Isham et al, 2013). Actualmente hay un ensayo clínico en fase II (NCT01236547) que estudia los efectos adversos y la eficacia de la combinación de radioterapia de intensidad modulada y Paclitaxel con o sin Pazopanib en pacientes con ATC.

Con el fin de encontrar nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento del ATC, se deben explorar estrategias adicionales como la inmunoterapia que intentan estimular el sistema inmunitario para atacar y matar las células tumorales (Boussiotis et al, 2016). Los mecanismos inmunosupresores incluyen la unión del Ligando-1 de muerte programada (PD-L1) con su receptor PD1 expresado en las células T, bloqueando la función de las células T efectoras. En ATC, la mutación BRAFV600E está fuertemente asociada con la expresión de PD-L1 (Bastman et al, 2016). El papel de la inmunoterapia se ejemplificó mediante una pionera respuesta excepcional observada durante el tratamiento combinado con Vemurafenib (inhibidor de BRAFV600E) y Nivolumab, anticuerpo monoclonal IgG4 anti-PD1 humano que al unirse al receptor impide la unión del ligando PD-L1 (Kollipara et al, 2017). Varios ensayos clínicos que utilizan inhibidores / anticuerpos dirigidos a PD-1 y PD-L1 están en curso para ensayos clínicos en pacientes con ATC.

Según la base de datos ClinicalTrials.gov (<https://ClinicalTrials.gov>), uno de los ensayos clínicos está en fase II (NCT03181100) y usa el Atezolizumab (Tecentriq, anticuerpo monoclonal que se une directamente a PD-L1) combinado con quimioterapia para ver si el tratamiento en pacientes con ATC y PDTC funciona mejor que los tratamientos estándar. En este estudio se usan cuatro cohortes que están basadas en las mutaciones de los pacientes. En la cohorte uno se incluyen los pacientes con la mutación BRAFV600E que reciben el Atezolizumab combinado con el Vemurafenib (Zelboraf) y Cobimetinib (Cotellic). La cohorte dos incluye a los pacientes con las mutaciones RAS o NF1 que reciben el tratamiento Atezolizumab con Cobimetinib. En la cohorte tres están los pacientes sin estas mutaciones pero que cumplen los criterios y son tratadas con atezolizumab combinado con Bevacizumab (Avastin). La cohorte cuatro incluye los pacientes que no tienen las mutaciones y que no cumplen los criterios y son tratados con Atezolizumab más quimioterapia con Paclitaxel (Taxol) o Nab-Paclitaxel (Abraxane). Otro ensayo clínico en fase 2 (NCT03246958) estudia el Nivolumab (Opdivo™) combinado con el Ipilimumab (Yervoy™). En fase I hay



un ensayo clínico (NCT03085056) que usa el Trametinib combinado Paclitaxel.

Anteriormente se realizaron otros estudios para el tratamiento del carcinoma anaplásico de tiroides.

La Fosbretabulina (CA4P) es un agente que altera el sistema vascular inhibiendo la polimerización de la tubulina y actúa selectivamente en las células endoteliales tumorales recién formadas (Dark et al, 1997). Un ensayo en fase III, FACT-2 utilizó Carboplatina / Paclitaxel con o sin Fosbretabulina (CA4P). Este ensayo asignó al azar a 80 participantes de ATC para recibir Carboplatina y Paclitaxel con o sin CA4P (Sosa et al, 2014). La supervivencia a 1 año mejoró de solo un 9% en pacientes que recibieron Carboplatina / Paclitaxel a un 26% en pacientes que recibieron también Fosbretabulina. Los efectos secundarios más comunes incluyen hipertensión, fatiga, alopecia y diarrea. El ensayo clínico fue retirado por la incapacidad para reclutar participantes en un tiempo razonable.

La Crolibulina (EPC2407), que funciona de manera similar a la Fosbretabulina al interrumpir el flujo sanguíneo del tumor a través de la ruptura de las células endoteliales vasculares, también se ha estudiado en pacientes con ATC. Un estudio encontró que uno de los ocho pacientes tratados con este agente, junto con el Cisplatino, consiguió una respuesta completa, mientras que en otro paciente la enfermedad se volvió estable (Gramza et al, 2013).

En un estudio el Selumetinib (AZD6244, inhibidor de MEK) rediferenció casos de ATC refractario al yodo radioactivo en sensible a la captación del yodo pudiendo ser usado como una terapia complementaria (Ho et al, 2013).

Con el objetivo de mejorar la eficacia de Paclitaxel, un ensayo clínico de fase I con una combinación de Paclitaxel y el agonista de PPAR $\gamma$  (Efatutazona) demostró seguridad y mereció una evaluación adicional en pacientes con ATC en fase II (NCT02152137) que está en curso. (Smallridge et al, 2013; Cabanillas et al, 2016).

Los reordenamientos de ALK que se producen en otros tipos de cáncer son un objetivo terapéutico efectivo. En estudios preclínicos y

clínicos se han desarrollado una serie de pequeñas moléculas inhibidoras de la kinasa ALK. Una de ellas es el Crizotinib, una aminopiridina que funciona como potente inhibidor competitivo con ATP de las kinasas ALK y MET. Crizotinib se administra por vía oral y se usa para el tratamiento del cáncer de pulmón que tienen reordenamientos de EML4-ALK (Kelly et al, 2014).

También se han hecho estudios en líneas celulares y animales.

La señalización de NF- $\kappa$ B es crucial en la progresión de ATC y puede ser dirigida empleando inhibidores de proteasoma. El tratamiento con Carfilzomib (inhibidor de proteasoma) produjo una reducción de la propagación de metástasis y de la enfermedad en ratones (Mehta et al, 2015a). De manera similar, la administración de YM155 (inhibidor de la survivina) y CUDC-101 (Inhibidor de la histona desacetilasa y del EGFR) mostró una reducción de crecimiento tumoral significativo y de metástasis en líneas celulares de carcinoma anaplásico de tiroides e *in vivo* en tumores de xenografts (Zhang et al, 2015; Mehta et al, 2015b).

Otro estudio también demostró que en la línea celular anaplásica células 8505C, la transfección de p53 *wild type* activa el promotor de NIS, lo que aumentó la captación de yodo radioactivo y la muerte celular apoptótica en comparación con las células 8505C normales que presentaban la mutación p53 (Liu et al, 2017).

Una categoría recientemente emergente son los moduladores epigenéticos, como los inhibidores de BET (Bromodominio extra-terminal). Estos ejercen su función biológica teniendo como diana el bromodominio y el extremo terminal de las proteínas BET, que interactúan con las HDAC y regulan la expresión génica. Dos inhibidores de BET recientemente descubiertos, JQ1 e I-BET762 bloquearon el ciclo celular en líneas celulares de ATC y actuando en MCM5, una proteína que está altamente sobreexpresada en muestras de tejido PTC y ATC, lo que indica su potencial como diana molecular. Usando también un modelo de ratón para el carcinoma anaplásico de tiroides, el ratón *Thrb<sup>PV/PV</sup>Kras<sup>G12D</sup>*, JQ1 inhibió el crecimiento de los tumores tiroideos y prolongó la supervivencia de estos ratones (Mio et al, 2016; Zhu et al 2017).



En resumen, el ATC sigue siendo un desafío clínico debido a su fenotipo indiferenciado y sus características clínicas altamente agresivas. Al ser un cáncer muy raro y con una mortalidad tan rápida y elevada, la falta suficiente número de pacientes es una limitación para realizar estudios prospectivos. La evaluación de datos celulares, genómicos y moleculares es fundamental para desarrollar mejores enfoques diagnósticos y terapéuticos para esta enfermedad. El desarrollo de la medicina de precisión necesitará del análisis exhaustivo de los marcadores farmacológicos para predecir el curso del tratamiento (Saini et al, 2018). Las comunidades clínicas y científicas aunadas tendrán que hacer un esfuerzo conjunto para establecer grandes ensayos clínicos multicéntricos que demuestren la efectividad de las nuevas terapias el ATC, dado que actualmente no hay un tratamiento efectivo (Molinaro et al, 2017).



### ***1.3 Interferencia con la expresión de RNA: una potencial vía de nuevos tratamientos***

#### **1.3.1 El RNA de interferencia (RNAi)**

La interferencia de RNA se refiere al uso de oligonucleótidos para actuar en los ácidos ribonucleicos (RNA), como tratamientos terapéuticos o en estudios de investigación para entender las funciones de los genes. Los oligonucleótidos son distintos de otras modalidades farmacológicas, como moléculas pequeñas inhibitoras (SMI) o los anticuerpos que van dirigidos principalmente a las proteínas, debido tanto a sus mecanismos de acción como a sus propiedades químicas.

Los ácidos nucleicos tienen dos formas: ácidos desoxirribonucleicos (DNA) y ácidos ribonucleicos (RNA). Aunque el DNA es más estable, el RNA ofrece una mayor variedad estructural que va desde el RNA mensajero (mRNA), que codifica la proteína, a los RNA no codificantes como microRNA (miRNA), RNA de transferencia (tRNA), RNA interferentes cortos (siRNA), RNA ribosomal (rRNA), y los RNA largos no codificantes (lncRNAs). En este momento, se estima que se transcribe más del 80% del genoma. Cuanto más se profundiza en la comprensión de la amplia variedad de RNA más interés de los investigadores para actuar sobre los distintos tipos de RNA, ya que se conoce que, además de su implicación directa en la codificación de proteínas, muchas de sus funciones son regulatorias de la expresión de dichas proteínas (Bennett et al, 2010).

La aplicación reciente del mecanismo de RNAi como tratamiento terapéutico es una innovación tremenda (Dana et al, 2017). Los tratamientos con RNAi se plantean cuando el RNA es la propia diana terapéutica. Se emplean dos métodos principales en el tratamiento con RNA: RNA de interferencia de doble cadena (dsRNAi) y oligonucleótidos antisentido (ASO). En términos generales, el dsRNAi actúa específicamente en la secuencia y después de la transcripción activando las ribonucleasas que, junto con otras enzimas y complejos, degradan un RNA concreto de manera coordinada fragmentándolo en trozos más pequeños (Agrawal et al, 2003). El RNAi efectivo se demostró inicialmente mediante la aplicación de RNAi sintético (Fire

et al, 1998). Más tarde, se encontró que el dsRNAi transcrito *in vitro* por la RNA polimerasa T7 era activo. Los ASO se unen a su ácido nucleico diana mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick, e inhiben o alteran la expresión génica a través del impedimento estérico, *splicing* alternativo, el inicio de la degradación diana u otros eventos (Chery, 2016). Una tercera opción es la interferencia de RNA a partir de una estructura de RNA *hairpin*, el shRNA, que puede transcribirse en células a partir de un promotor de RNA polimerasa III en una construcción de plásmido (Yu et al, 2002; Miyagishi and Taira, 2002). Aunque el siRNA y el shRNA se pueden aplicar para lograr resultados funcionales similares, el siRNA y el shRNA son moléculas intrínsecamente diferentes. Por lo tanto, los mecanismos moleculares de acción, las vías de interferencia de RNA, los efectos *off-target* y las aplicaciones también pueden ser diferentes.

#### I.3.1.1 Los genes miRNA y el mecanismo natural de RNAi

En 1998, el descubrimiento de los RNAi revolucionó la comprensión de la regulación de los genes cuando se descubrió que los efectores de silenciamiento en *Caenorhabditis elegans* eran RNAi de doble cadena (Fire et al, 1998). Por este hecho Andrew Z. Fire y Craig C. Mello ganaron en 2006 el premio nobel de medicina. El RNA de interferencia (RNAi) es un proceso altamente conservado de silenciamiento génico postranscripcional que se desencadena por pequeñas moléculas de RNA reguladoras de doble cadena (dsRNAi) (Fire et al, 1998; Zamore et al, 2000). En 1999, se descubrieron los siRNA en plantas y se demostró que guían la escisión endonucleolítica dependiente de secuencia de los mRNA de manera similar a los que regulan en células de mamíferos (Tomari et al, 2005). En el año de 2001, se descubrió que los miRNA comprendían una amplia clase de pequeños reguladores de RNA, con docenas de representantes específicos de especie en animales y plantas (Bartel, 2004). Con este descubrimiento, se demarcaron dos categorías de pequeños RNA: los siRNA, como defensores de la integridad del genoma en respuesta a ácidos nucleicos extraños o invasivos, como transposones, transgenes y virus, y los miRNA, como reguladores de genes endógenos (Meister et

al, 2004). En 2001, se utilizaron pequeños RNAi sintéticos para silenciar y determinar los principios básicos de la estructura del siRNA y la mecánica del proceso de interferencia de RNA, proporcionando la base para desarrollar aplicaciones del RNAi (Elbashir et al, 2001).

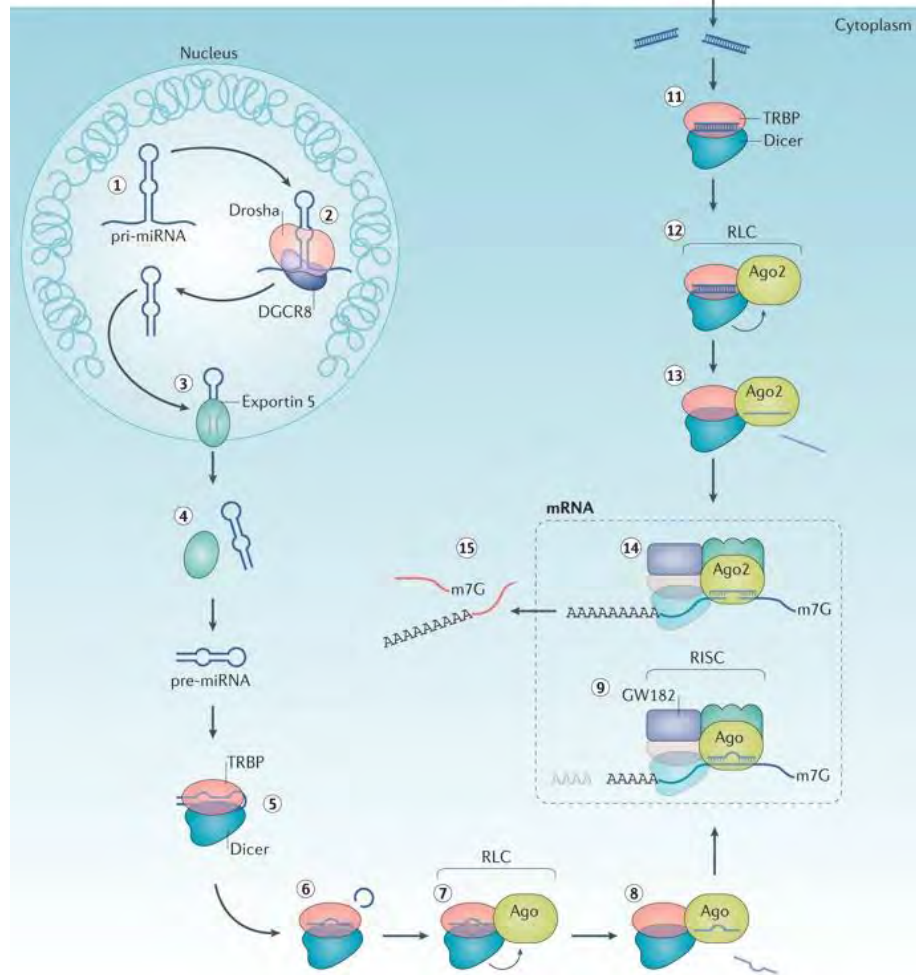
En la ruta de RNAi, los dsRNAis largos expresados de manera endógena, derivados de transcripción convergente o de un RNA de estructura en *hairpin*, se cortan en el citoplasma de manera progresiva por DICER1, un miembro de la familia de las RNasa III, en RNAs cortos de doble cadena (aproximadamente 21 nucleótidos), denominados RNAi de interferencia pequeños o siRNA (Okamura et al, 2008). Estos siRNA tienen una región doble de 19 nucleótidos característica con grupos *overhang* terminales en 3' en cada uno de los extremos (Zamore et al, 2000; Bernstein et al, 2001).

DICER1 procesa el pre-microRNA en miRNA maduro y el dsRNA en siRNA (Bernstein et al, 2001). DICER1 interactúa con la proteína de unión a RNA de Tat de doble cadena (TRBP) o PACT (proteína activadora de PKR) para mediar el RNAi y el procesamiento de miRNA (Kok et al, 2007). Tras su formación, los siRNA están unidos por un complejo componente multiproteico denominado RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA) (Hammond et al, 2000). Los dsRNA pueden omitir el procesamiento por DICER1 y pueden asociarse directamente con el complejo RISC (Rao et al, 2009; Wittrup and Lieberman, 2015; Lin and Gregory, 2015).

Dentro del complejo RISC, las cadenas de siRNA se separan y la cadena con el extremo 5' más estable está típicamente integrada en el complejo RISC activo. El componente de siRNA monocatenario antisentido guía y alinea el complejo RISC con el mRNA diana. AGO2 un miembro de la familia argonauta con función catalítica dentro del RISC procede a la escisión endonucleolítica del mRNA diana y, como consecuencia, se produce el silenciamiento de la expresión génica (Liu et al, 2004). Para la degradación del mRNA se incorporan proteínas en agregados conocidos como *P-bodies* (Parker et al, 2007; Luo et al, 2018). Los *P-bodies* (cuerpos de procesamiento) se habían descrito como gránulos de ribonucleoproteínas (RNP) citoplasmáticas compuestos principalmente por mRNAs reprimidos por modificaciones

post-traduccionales y por factores proteicos relacionados con la degradación del mRNA. A partir del descubrimiento del mecanismo miRNA/siRNA, se descubre que la cadena de miRNA maduro o el siRNA que viene del exterior, se unen al “complejo silenciador inducido por RNA (*RNA-induced Silencing Complex*, RISC) que contiene las proteínas Argonaute (AGO 1-4) (Parker et al, 2007; Luo et al, 2018; Setten et al, 2019). Allí se separan las dos cadenas, *passenger* y *guide* (que es la complementaria y funcional). El complejo RISC une a partir de entonces el mRNA diana y otras proteínas como la familia de proteínas GW182 (realmente llamada TNRC6A) responsables de la actividad RNA-asa del complejo (Gregory et al, 2005; Setten et al, 2019). La represión del gene ocurre por degradación de mRNA e inhibición traslacional en los P-bodies pero estos no son siempre necesarios para el silenciamiento de genes mediado por siRNA (Liu et al, 2005; Eulalio et al, 2007). Como algunos factores implicados en los agregados P-bodies se encuentran también en el citoplasma, aún no se ha resuelto si la degradación del mRNA se produce dentro de los *P-bodies* o en el citoplasma (Parker et al, 2007; Luo et al, 2018; Setten et al, 2019) (Imagen I. 1).

Extracellular  
space

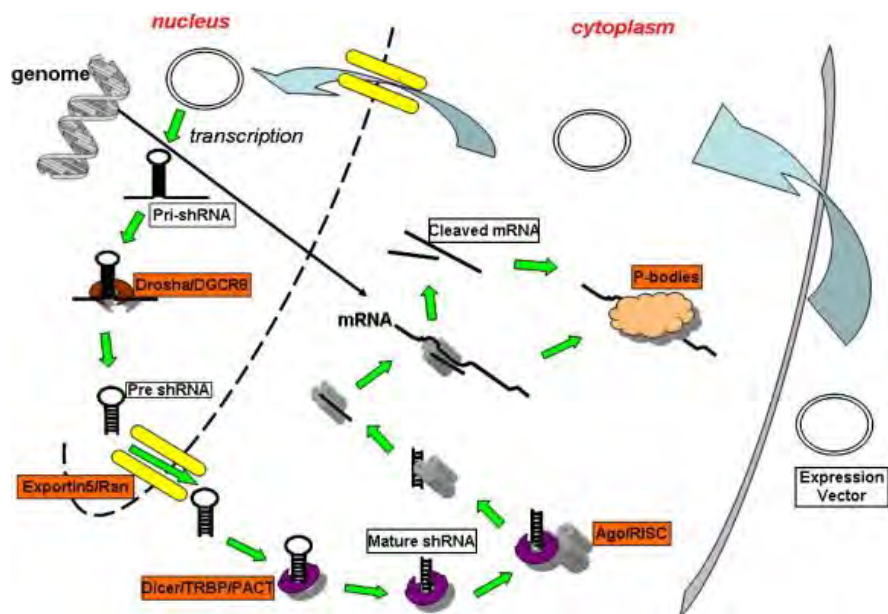


**Imagen I.1. Esquema de la ruta del RNA de interferencia mediado por siRNA.**  
Original a partir de la referencia Setten et al, 2019. Permitido por Nature Rev Drug  
Discovery.

### I.3.1.2 Los shRNA sintéticos

Los shRNA, al revés de los RNAi exógenos, se sintetizan en el núcleo de las células, se procesan y se transportan al citoplasma, y luego se incorporan al RISC para su actividad (Zeng et al, 2005). Después de la administración del vector de expresión de shRNA en el citoplasma, el vector necesita ser transportado hacia el núcleo para que comience su transcripción (Imagen I. 2). Los transcritos primarios (pre-shRNA) siguen una ruta similar a la descubierta para los transcritos primarios de microRNA, y son procesados por el complejo Drosha / DGCR8 dando lugar a pre-shRNAs (Lee et al, 2003). Los pre-shRNAs se transportan al citoplasma a través de la *exportin 5*, para cargarlos en el complejo DICER / TRBP / PACT, donde se procesan aún más para producir el shRNA maduro (Yi et al, 2003). El shRNA maduro en el complejo DICER / TRBP / PACT se asocia con la proteína Argonauta que contiene RISC y proporciona la función de interferencia de RNA a través de la escisión y degradación del mRNA, o mediante la supresión de la traducción por la vía de los *P-bodies* (Preall and Sontheimer, 2005; Parker et al, 2007).





**Imagen I.2. Esquema de la ruta del RNA de interferencia mediado por shRNA.** Original a partir de la referencia Rao et al, 2009. Permitido por Advanced Drug Delivery Reviews.

Aunque los shRNA sean efectivos, la sobreexpresión estable de los shRNA se ha asociado, en algunos casos, con efectos citotóxicos resultantes de la supresión de moléculas endógenas ya que hay cantidades limitadas de los componentes de la ruta del RNAi (An et al, 2006; Grimm et al, 2006). Además, las toxicidades derivadas de la integración en el material genético del huésped de los vectores basados en retrovirus, un abordaje comúnmente utilizado para el suministro estable de shRNA a muchos tipos de células, han suscitado preocupaciones sobre la seguridad de este sistema de suministro para su utilización en clínica (Noguchi, 2003). Una de las más demostradas es el riesgo oncogénico potencial de esta integración. Por el contrario, los siRNAs químicamente sintetizados pueden silenciar eficazmente la



expresión génica sin alterar el material genético del huésped. Además, el suministro de siRNA puede alterarse según las necesidades clínicas específicas, y el tratamiento puede suspenderse, según se justifique, sin efectos a largo plazo (Dominska et al, 2010).

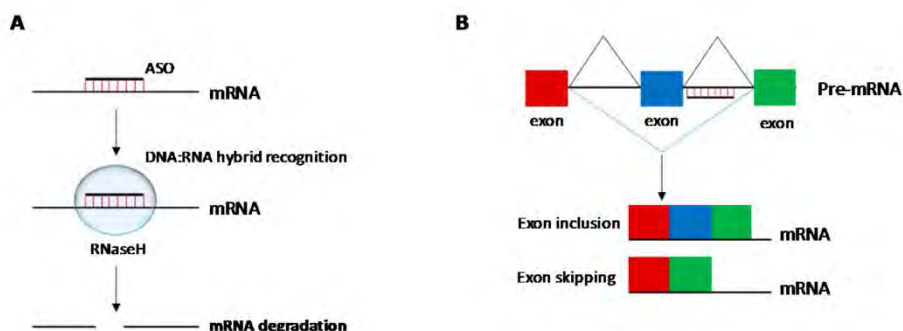
### **I.3.2 Oligonucleótidos antisentido (ASOS)**

Los ASO son oligonucleótidos cortos monocatenarios con estructuras basadas en ribonucleótidos, deoxiribonucleótidos o combinación de deoxiribo- y ribonucleótidos u otros nucleótidos modificados, que pueden unirse de manera específica al RNA mediante la hibridación de Watson-Crick (Shen and Corey, 2018). Los ASO deben poder cruzar la membrana celular para unirse al RNA diana en el núcleo (pre-mRNA, mRNA, lncRNA).

Los ASO pueden funcionar a través de dos mecanismos dependiendo, en parte, de su diseño y composición de nucleótidos, de la región del RNA diana a la que va dirigida el ASO y de sus propiedades químicas tras modificaciones. Las secuencias de mRNA diana de los ASO se eligen en función de su accesibilidad de hibridación. Se determinó que dentro de los RNAs diana las secuencias ideales para los ASOs son aquellas que se localizan en los extremos terminales, en los *loops* internos o en las secuencias *joint*, *hairpins* y protuberancias de 10 o más bases. (Chan et al, 2006). Los ASO silencian la expresión génica mediante una variedad de mecanismos, entre los cuales se incluyen: 1) inhibir la formación del gorro de guaninas 5' en el extremo inicial del mRNA (5'*cap*), 2) bloqueamiento estérico de la traducción a proteína, 3) inhibir o alterar el *splicing* del RNA, corte y empalme de los exones, y 4) la activación de la RNasa H, que degrada el mRNA diana (Crooke et al, 1999; Crooke et al, 2000; Chan et al, 2006).

Dentro de las terapias RNA de la FDA se incluyen dentro oligonucleótidos monocatenarios que mediante modificaciones forman estructuras tridimensionales estables capaces de unirse con alta afinidad y especificidad a muchas dianas y se denominan aptámeros (Sharma et al, 2014). Los aptámeros se unen directamente a una proteína en

oposición a los ASO que se unen a RNA. Macugen, un medicamento ASO aprobado por la FDA para la degeneración macular, es un aptámero de segunda generación que se une a VEGF165, el factor de crecimiento implicado en esta enfermedad (Sivaprasad et al, 2008; Friberg et al, 2010). Estos no son ASO ya que no interfieren con el RNA y se unen directamente a proteínas.



**Imagen I.3. Mecanismos de regulación de los genes por oligonucleótidos antisentido (ASO).** a) Tecnología antisentido: la RNaseH que es capaz de reconocer complejos híbridos de DNA/RNA que conducen a la degradación del mRNA y al bloqueo de la síntesis de proteínas. b) Mecanismos de procesamiento (*splicing*) de RNA para restaurar el fragmento de lectura interrumpida de un gen mediante el uso de ASO que se dirigen a las uniones de intrón y exón. Adaptado a partir de la referencia Grijalvo et al, 2018. Permitido por Genes (CC BY 4.0).

Los ASOs generalmente se modifican con enlaces de fosforotioato (PS) en donde se reemplaza uno de los oxígenos del fosfato (P) por un azufre (S) en los enlaces azúcar-fosfato entre nucleótidos. La presencia de PS a lo largo de toda la secuencia de oligonucleótidos confiere cierto nivel de resistencia frente a las endo y las exonucleasas aumentando su estabilidad. De esta forma, cuando un ASO normal se une a un mRNA diana complementario, se inicia la activación de RNasaH dando lugar a la degradación del mRNA y la consiguiente inhibición de la producción de una determinada proteína) (Imagen I. 3a). La actividad antisentido también puede producirse a través de mecanismos no degradantes que no activan la escisión del

mRNA por la enzima endonucleasa. El diseño correcto de los ASO permite seleccionarlos para dirigirlos a cerca de las uniones intrón-exón que dan lugar a la inclusión de exones o procesos de omisión de exones con un efecto terapéutico determinado que elimina secuencias de mRNA causantes de enfermedad (Imagen I. 3b).

Los ASO se modifican químicamente para aumentar la estabilidad, afinidad, especificidad y distribución, reduciendo el potencial efecto *off target* (Kole et al, 2012). Sin estas modificaciones, las moléculas de ácido nucleico se degradan por exo y endonucleasas en el torrente sanguíneo (Moreno et al, 2014), y no pueden cruzar la membrana plasmática, ya que los ASO no modificados tienen carga negativa (Chan et al, 2006). Las modificaciones químicas de los ASO se clasifican generalmente como primera generación, segunda generación y tercera generación. Los ASO se nombran según estas modificaciones químicas y cómo se integran dichas modificaciones en su estructura (Shen and Corey, 2018).

Estas limitaciones se arreglaron mediante las modificaciones de segunda generación que modifican el residuo de azúcar de la nucleobase (pirimidina, purina), lo que aumenta la afinidad de unión al RNA diana. Una de las modificaciones más comunes es hacer puentes entre átomos del propio nucleótido (*bridged*). De ellas la más conocida es la LNA (*locked nucleic acid*) (Sharma et al, 2014). La química del LNA tiene el oxígeno 2' y el carbono 4' del azúcar de la ribosa del ribonucleótido unidos entre sí en una estructura de anillo. Esta modificación aumenta la especificidad, la afinidad y la vida media, lo que permite un suministro efectivo a los tejidos de interés con menor toxicidad. Además, la química no interfiere con la capacidad de las moléculas de RNA que contienen LNA para incorporarse a la maquinaria de RNAi.

Otra modificación estructural es incorporar un segmento de DNA en medio y así inducir la activación la RNAasa H para la escisión del mRNA diana. Luego se agregan modificaciones al final de la secuencia para aumentar la afinidad y la estabilidad mientras se protege la secuencia de DNA interna de la degradación. Los GapmeRs son ASO con un tramo de DNA en el medio (*gap*), típicamente flanqueado por

LNA u otras moléculas químicas patentadas que protegen de la degradación de las nucleasas y aumentan su afinidad (Lundin et al, 2013). La pieza de DNA central ayuda a desencadenar la degradación del RNA diana por la RNAasa H. Mipomersen, el segundo fármaco ASO aprobado por la FDA para la hipercolesterolemia familiar es un GapmeR dirigido con el mRNA de la Apo-B-100, la proteína base de las partículas LDL y VLDL (Crooke et al, 2013).

La compañía Exiqon ha desarrollado los LNA Gapmers de tercera generación. Para ello primero ha diseñado un algoritmo específico donde, para cada RNA diana, el algoritmo evalúa miles de diseños teniendo en cuenta más de 30 parámetros de diseño para seleccionar GapmeRs de LNA <sup>TM</sup> antisentido con la mayor probabilidad de generar una degradación potente y específica del RNA diana. Tradicionalmente, las compañías farmacéuticas han analizado cientos de oligonucleótidos antisentido *in vitro* para identificar la secuencia ASO más efectiva. Sin embargo, Exiqon con su algoritmo preselecciona los diseños más potentes, lo que reduce significativamente el número de pruebas en la selección *in vitro*. Algunos de los parámetros del algoritmo son (Exiqon; [www.exiqon.com/ls/Documents/Scientific/ExiqonInVivoGuidelines.pdf](http://www.exiqon.com/ls/Documents/Scientific/ExiqonInVivoGuidelines.pdf)):

- accesibilidad óptima de la secuencia diana: para garantizar una alta potencia la herramienta de diseño selecciona las secuencias de destino según la predicción de la estructura secundaria local;

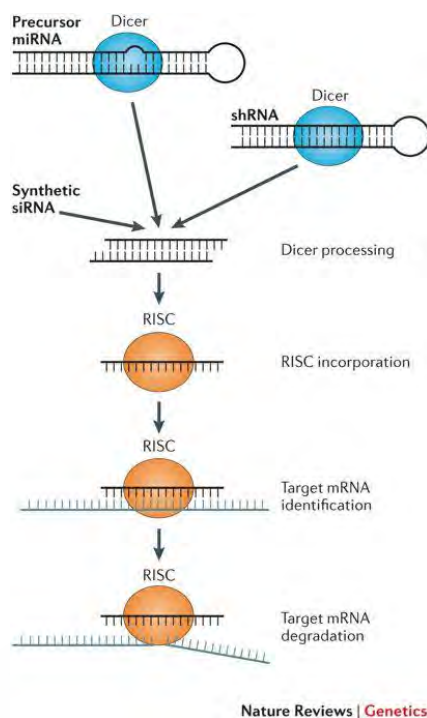
- máxima especificidad: las secuencias de LNA <sup>TM</sup> GapmeR antisentido se alinean con Ensembl (Zerbino et al, 2018; <https://www.ensembl.org>;) para la selección de los GapmeR de LNA <sup>TM</sup> más específicos con un mínimo de *off target* en los transcriptomas *spliced* y *unspliced*;

- propiedades físicas óptimas del oligonucleótido: longitud, T<sub>m</sub>, tamaño del gap, posiciones auto-complementarias (*self-complementarity*), y posiciones modificadas LNA <sup>TM</sup>. Los LNA <sup>TM</sup> GapmeR antisentido han tenido también buenos resultados en estudios *in vivo* con modelos animales de xenograft humanos (Xing et al, 2014; Ali et al, 2018) y han sido probado con éxito en un ensayo clínico en humanos (Hydbring and Badalian-Very, 2013).

### I.3.3 Los dsRNAi (considerados como los verdaderos siRNAs)

Los dsRNAi que son administrados exógenamente (siRNAs *double strand* con aproximadamente 22 nucleótidos con dos nucleótidos *overhang* en los extremos 3') usan la misma maquinaria que los RNAi endógenos, pero ya directamente en el citoplasma uniéndose a Ago en la última parte del proceso celular habitual (Wittrup and Lieberman, 2015).

El miRNA se incorpora en el complejo RISC mediante la unión a AGO2 (Jinek et al, 2009; Meister, 2013). La hebra guía (*guide* o *antisense*) se mantiene y la otra hebra considerada “pasajera” (*passenger* o *sense*) se degrada. La cadena guía del miRNA conducen el complejo AGO2-RISC al mRNA diana (He et al, 2004). El mRNA se silencia mediante la inhibición de la traducción y/o su degradación por exonucleasas activadas a partir de la formación del P-body, y/o secuestro en el *P-body* (Teixeira et al, 2005; Guo et al, 2010; Luo et al, 2018) (Imagen I.4).



**Imagen I.4. Mecanismo de silenciamiento de genes por siRNA.**  
Original a partir de la referencia Wittrup and Lieberman, 2015. Permitido por Nature Reviews Genetics.

### I.3.4 Modificaciones y métodos de distribución de los RNAi en su potencial uso como terapia

Las estrategias basadas en RNAi se han utilizado ampliamente para el silenciamiento dirigido de la expresión génica en una variedad de contextos, incluida la inhibición de genes patógenos. Sin embargo, la aplicación de los siRNA como posibles agentes silenciadores terapéuticos requiere el desarrollo de reactivos que puedan dirigir eficazmente los siRNA al citoplasma de las células diana apropiadas en dosis clínicamente relevantes. Para ser efectivos, deben optimizarse en todas las etapas del proceso de distribución, desde el reconocimiento de

la célula diana hasta la captación y la excisión del mRNA a partir del RISC (Dominska et al, 2010).

En el desarrollo de terapias RNA (RNA Therapies o RNAi Therapeutics para la FDA) para ser usado como fármacos en ensayos clínicos, fue necesario investigar diversas modificaciones químicas para mejorar cualidades como disminuir la inmunoestimulación, el suministro suficiente a los órganos / células diana, los efectos *off target*, la potencia del RNAi y la estabilidad sérica (Watts et al, 2008). En relación a todas estas características, también han sido estudiadas varias formas de administración de los RNAi (Guo et al, 2010; Wang et al, 2010; Shen and Corey, 2018).

Los vectores virales y los vehículos de administración no virales son las dos categorías principales del sistema de administración de RNAi. La síntesis y la efectividad de la producción industrial ofrecen ventajas en los sistemas de administración no virales, entre los que destacan polímeros, péptidos y lípidos (Dana et al, 2017).

Varios sistemas de administración basados en lípidos han sido estudiados para la aplicación de los RNAi *in vivo*. Se generó una biblioteca con más de mil moléculas derivadas de lípidos y se hizo un *screening* para evaluar la eficiencia de la administración de RNAi en ratones (Akinc et al, 2008). Se concluyó que algunos de ellos eran mucho más eficaces que otros sistemas que no encapsulaban los RNAi (Akinc et al, 2008).

Entre ellos destacaron los liposomas que han sido utilizados durante muchos años por su eficacia en la introducción de los ácidos nucleicos a las células animales y humanas a través de la lipofección (Felgner et al, 1987; Malone et al, 1989). La interacción de los lípidos con los ácidos nucleicos forma lipoplexos (Gavrilov et al, 2012).

Los sistemas de administración basados en polímeros se han utilizado ampliamente para el DNA plasmídico y, más recientemente, para RNAi (Gary et al, 2007; Wu et al, 2012). Muchos polímeros han sido investigados como vectores de RNAi y plásmidos no virales debido a sus características físicas, sus diferentes propiedades químicas bien caracterizadas, y su flexibilidad de estructura, lo que permite una



fácil modificación para ajustar sus propiedades físico químicas. Se sabe que el quitosano tiene baja citotoxicidad y que es un polisacárido catiónico que tiene potentes propiedades adhesivas. La ciclodextrina es otro polímero que también se ha estudiado como sistema de administración de RNAi (Dana et al 2017).

Los péptidos se consideran una alternativa a los polímeros catiónicos para la administración de RNAi por su administración celular específica, mayor sensibilidad al pH de la membrana, ruptura directa de la membrana, su eficiente empaquetamiento y transporte a la membrana. El control sobre la funcionalización, la facilidad de síntesis y la estabilidad del complejo entre el péptido y el oligonucleótido hacen que los péptidos de bajo peso molecular sean los candidatos favorables sobre los lipoplexos como vehículo de administración de RNAi (Dana et al, 2017).

La combinación de dos o más tipos de vehículos de distribución ha llevado a la generación de varias categorías. Estas combinaciones pueden clasificarse como Péptido-Polímero, Liposoma-Péptido y Liposoma-Polímero (Dana et al, 2017).

Las nanopartículas orgánicas incluyen nanopartículas de polímeros catiónicos y sistemas basados en lípidos. Los fármacos pueden incorporarse a las nanopartículas orgánicas a través de enlaces químicos o incrustaciones físicas (Merkel et al, 2009). Se han utilizado como vehículos polímeros catiónicos como polímeros sintéticos -por ejemplo, polietilenimina (PEI), poli-L-lisina (PLL) y policationes basados en ciclodextrina-, y polímeros naturales -por ejemplo, quitosano y atelocolágeno-. PEI es un polímero catiónico ampliamente estudiado para la administración de RNAi; sin embargo, el PEI no ha progresado clínicamente, principalmente debido a su bajo perfil en los ensayos de toxicidad y a su inestabilidad *in vivo*, particularmente durante la administración sistémica (Nayak et al, 2013). Se ha utilizado polietilenglicol (PEG) para reducir la citotoxicidad del PEI (Kim et al, 2008; Wu et al, 2010).

Hay muchos estudios proponiendo diferentes métodos de administración de los RNAi, pero las estrategias más avanzadas actualmente en clínica son las que se describen a continuación. Las



primeras estrategias para resolver los problemas duales de la administración intracelular y la rápida excreción incluyeron la incorporación de los RNAi en nanopartículas lipídicas (LNP): análogos de los lipoplexos utilizados para la transfección de laboratorio, pero más pequeños y homogéneos (Semple et al, 2010; Shi et al, 2011). Sin embargo, estos complejos se acumulan en el hígado y otros órganos de filtración, lo que limita su eficacia para penetrar en otros tejidos. Las LNPs y las nanopartículas también pueden penetrar en la vasculatura más permeable (Bartlett et al, 2007; Judge et al, 2009). Sigue sin estar claro si la permeabilidad y retención mejoradas de la vasculatura del tumor podrían llevar a una desactivación efectiva de un gen en cánceres sólidos que fueran tratados con nanopartículas, especialmente porque la vascularización tumoral deficiente (y su consecuencia, la hipoxia) son comunes.

Los RNAi también pueden ser dirigidos de forma tejido-específica hacia un tejido o tipo de células concreto aprovechando un anticuerpo de alta afinidad o fragmentos funcionales de inmunoglobulinas (Song et al, 2005; Peer et al, 2008), o aptámeros (ácidos nucleicos seleccionados para unión de alta afinidad) (McNamara et al, 2006; Wheeler et al, 2011; Berezchnoy et al, 2014), o ligandos de un receptor (Davis et al, 2010; Wong et al, 2012; Nair et al, 2014) para unirse a los receptores de la superficie celular y mediar la captación específica por la célula diana. Las ventajas son claras: efectividad a una dosis más baja y toxicidad reducida y prevención de la destrucción inespecífica en tejidos no deseados. Las moléculas de selección pueden conjugarse directamente a los RNAi, unirse de forma no covalente o incorporarse a LNPs u otras nanopartículas. En particular, la administración subcutánea de los siRNA conjugados con N-acetilgalactosamina trivalente (GalNAc), que media la captación específica en hepatocitos a través de su restringida unión al receptor de asialoglucoproteína de hepatocitos (ASGPR), causa la represión completa y duradera de genes en el hígado como Transtiretina y Apolipoprotein B-100 sin limitación de la toxicidad, (Nair et al, 2014; Matsuda et al, 2015; Rajeev et al, 2015). La conjugación ligando-receptor GalNAc-ASGPR parece ser más efectiva que otros conjugados para RNAi que se han probado hasta ahora, que se incorporan a las

células, pero no resultan en una desactivación eficiente, posiblemente debido a una endocitosis o una liberación endocítica ineficientes (Willoughby et al, 2018).

La mayoría de los métodos de administración de RNAi involucran endocitosis a partir de la membrana plasmática mediante la formación de un endosoma. Por ejemplo, los siRNA necesitan escapar desde el endosoma al citosol donde se localiza el RISC y esto es una barrera importante. Solo un pequeño porcentaje de los siRNA contenidos en LNP que son absorbidos por la célula se liberan en el citoplasma. No está claro el mecanismo de liberación endosomal exacto, e incluso podría variar dependiendo del tipo de partícula usada como vehículo. Pero para algunas más estudiadas, como por ejemplo el siRNA recién aprobado para uso humano Patisirán, se cree que la LNP (que contiene PEG, colesterol, un lípido polar DSPC, lípido PEGilado PEG2000-C-DMG, y un lípido ionizable DLin-MC3-DMA que tiene una configuración muy abierta de sus dos colas) se incorpora al endosoma cuyo Ph ácido reioniza y altera la unión entre el siRNA y la LNP. A partir de ahí, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre el componente lipídico de la LNP y la membrana del endosoma unido a la configuración tan abierta del DLin-MC3-DMA, permiten el escape del siRNA al citoplasma (Setten et al, 2019).

De hecho, la liberación endosómica y la represión de genes se potencia mediante la co- transfección o transfección previa de polímeros catiónicos o con su incorporación a las nanopartículas de RNAi que se cargan de forma más positiva a medida que el endosoma se acidifica (Rozema et al, 2007; Wong et al, 2012). El endosoma alterado es reconocido rápidamente por las galectinas, que son sensores de glicoproteínas citosólicas que se dirigen al endosoma dañado para la autofagia (Thurston et al, 2012).

Además de los problemas asociados con la mejora de la administración de RNAi y los procesos posteriores de tráfico intracelular, existen otros problemas, como los efectos indeseados *off-target*, es decir, la supresión de genes distintos del objetivo deseado, lo que lleva a alteraciones peligrosas de la expresión génica y consecuencias funcionales inesperadas y de inmunogenicidad, que han

impedido hasta hace poco que la terapia basada en siRNA fuese una alternativa eficaz a los enfoques terapéuticos clásicos (Zimmermann et al, 2006; Lam et al, 2014; Shen and Corey, 2018). En relación a eso comentar las muertes de pacientes en el ensayo clínico de Revusiran, ENDEAVOUR, que aumentaron su proporción a 36 (tratado): 6 (placebo) respecto a las 12: 6 esperadas ya que el protocolo era una distribución 2:1 de pacientes en el brazo tratado (Garber, 2016). Alnylam suspendió el ensayo y realizó una investigación exhaustiva. (Garber, 2016). Aunque los pacientes fallecidos eran los que tenían la enfermedad más avanzada y mayor edad, lo cierto es que se murieron mucho más pacientes de los esperados con el tratamiento y las razones nunca fueron aclaradas (Garber, 2016). También se ha descrito Trombocitopenia como un efecto adverso severo en dos ensayos clínicos con ASO, Volanesoren e IONIS-TTRrx, lo cual hace temer que sea una complicación grave de cualquier terapia con ASOs (Shen and Corey, 2018).

La mayoría del silenciamiento génico *off target* del RNAi se debe a la homología parcial de la secuencia que existe en otros mRNA o DNA distintos a su mRNA diana, especialmente dentro de la región no traducida 3' (3'UTR) (Birmingham et al, 2006). Para evitar este problema, el diseño y la selección de siRNAs potentes deben realizarse con cuidado. Los parámetros básicos para elegir las secuencias diana de los RNAi consideran las secuencias repetidas internas, la estructura secundaria, el contenido de GC, la preferencia de base en posiciones específicas en la cadena en sentido 5'-3' (*sense*) y la longitud apropiada de los siRNAs (19–22 bps). Varias compañías que producen siRNA proporcionan algoritmos de diseño efectivos online, que permiten analizar la secuencia diana del mRNA, la estructura secundaria y las estabilidades finales del siRNA de doble cadena, y también permiten la minimización de posibles efectos *off-target* dependientes de la secuencia (Oh et al, 2009; Lam et al, 2014).

El efecto *off target* también puede ser un resultado de la respuesta inmune nativa. Muchas proteínas se unen a RNA o DNA. El RNAi puede ser reconocido por los inmunoreceptores como los TLR (*Toll-like receptors*), lo que lleva a la liberación de citoquinas y cambios en la expresión génica (Watts et al, 2008). La modificación

química de la cadena antisentido siRNA, en particular la modificación 2'-O-metilo de la posición 2 de la ribosa, puede reducir significativamente los efectos *off target* inmunogénicos (Judge et al, 2006; Judge et al, 2009; Shen and Corey, 2018) así como los demás *off target* (Jackson et al, 2006; Shen and Corey, 2018).

Otro mecanismo *off target* que se ha demostrado es la interferencia con las vías de miRNA endógenas de la célula ante un exceso de RNAi exógeno, que lleva a toxicidad *per se* cuándo es muy intensa, como se ha demostrado en ratones (Grimm et al, 2006). Aunque por ahora esto no parece haber sucedido en la clínica (Shen and Corey, 2018).

### **I.3.5 Terapias RNA aprobados por la FDA**

Según la declaración del Dr. Scott Gottlieb, Comisionado de la FDA en 2018, *“New technologies like RNA inhibitors, that alter the genetic drivers of a disease, have the potential to transform medicine, so we can better confront and even cure debilitating illnesses. We’re committed to advancing scientific principles that enable the efficient development and review of safe, effective and groundbreaking treatments that have the potential to change patients’ lives.”* (Gottlieb, 2018).

A pesar de los obstáculos encontrados en los ensayos clínicos que ralentizaron los ensayos clínicos con terapias basadas en RNA en la clínica como la inestabilidad, alta vulnerabilidad de los oligonucleótidos a la degradación por nucleasas; los efectos *off target*/toxicidad; distribución deficiente a los tejidos o la baja captación celular y la baja afinidad por el mRNA diana, las terapias RNA siguen teniendo un gran potencial ya que se calcula que sólo un tercio de las genes existentes en una célula pueden ser accesibles a través de biológicos (anticuerpos) o pequeñas moléculas inhibitoras (SMI) al ser proteínas de la superficie celular, o accesibles dentro del citoplasma. Eso dejaría dos tercios de los genes conocidos (proteínas nucleares, proteínas intracelulares no accesibles en el citoplasma, genes no

codificantes de proteínas) huérfanos de terapias (Matsui et al, 2017; Yu et al, 2019).

Durante estos últimos años se han realizado esfuerzos importantes para encontrar soluciones a estos problemas. Los obstáculos son comunes para ambos tipos de terapias RNA, ASO o dsRNAi.

De las primeras terapias aprobadas están los aptámeros incluídos dentro de este grupo, aunque realmente no utilicen un mecanismo de union con RNA. El Pegabtanib es un aptámero que es un tipo de oligonucleótido de cadena simple que se une específicamente a las moléculas diana. El Pegabtanib fue aprobado por la FDA para tratar la degeneración macular relacionada con la edad de la retina y va dirigido al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF165) (Gragoudas et al, 2004; Yi and Rogge, 2019). El Defibrotide es un oligonucleótido con una mezcla de cadena simple y cadena doble y no se sabe muy bien cómo funciona su mecanismo de actuación. El medicamento está indicado para la enfermedad veno-oclusiva hepática grave que se produce después de altas dosis de quimioterapia y trasplante de médula ósea (Stein et al, 2017; Yi and Rogge, 2019).

Están aprobadas por la FDA ocho terapias con oligonucleótidos, siete ASOS (Volanesorsen, Fomivirsen, Mipomersen, Eteplirsen, Nusinersen y Inotersen) y un siRNA (Patisiran).

En 2018 se ha aprobado por la FDA el Patisiran (desarrollado por la empresa Alnylam Pharmaceuticals Inc) como tratamiento para la amiloidosis familiar por mutación de Transtiretina (TTR). Se están haciendo estudios fase III-IV, ensayo APOLLO, post-aprobación para evaluar la eficacia a largo plazo (Ledford, 2018). El Patisiran consiste en un dsRNAi que fue diseñado para inhibir via RNA interferencia la expresión del gene para TTR. Este oligonucleótido esta encapsulado por nanopartículas lipídicas (LNP) conocidas por SNALP (stable nucleic acid lipid particle) desarrolladas por la empresa Arbutus Biopharma (Tekmira). Los LNPs usados en el Patisiran son de segunda generación, mucho más potentes que la primera generación y son compuestos por moléculas lipídicas sintéticas ionizables llamadas

*lipidoids*. Este compuesto fue desarrollado en colaboración con el laboratorio del Dr. Robert Langer (Whitehead et al, 2011).

En [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) a fecha de octubre de 2019, están activos varios ensayos clínicos utilizando dsRNAi. Vutrisiran, también contra TTR, se encuentra en Ensayo Fase III, ensayo HELIOS, en comparación con la aprobada Patisiran. En Fase III, ensayo ENVISION, en espera de los resultados de eficacia iniciales en la disminución de recurrencias, se encuentra el Givosiran (ALN-AS1) para el tratamiento de pacientes con porfirias hepáticas agudas (HAP), incluyendo porfiria intermitente aguda (AIP), porfiria variegata y coporporfiria hereditaria (Sardh et al, 2019; Fontanellas et al, 2019). El Inclisiran, siRNA anti la enzima proconvertasa hepática PKCS9, está en ensayo clínico Fase III, ORION, para su eficacia contra enfermedad cardiovascular aterosclerótica por altos niveles de LDL-C en pacientes con dosis máximas de hipolipemiantes y pacientes con hipercolesterolemia familiar. Lumasiran es un siRNA dirigido contra la glicolato oxidasa para la Hiperoxaluria Primaria tipo I que ha presentado resultados excelentes en el ensayo de Fase II ILLUMINATE, lo que permite su continuación.

Otros ensayos clínicos con siRNAs para cáncer están iniciándose: Celixir-STAT6, donde la eliminación de STAT6 usando múltiples secuencias de siRNA inhibe la proliferación e induce la apoptosis de las líneas celulares de cáncer de mama y colorrectal humano (Salguero-Aranda et al, 2019); MD Anderson: EphA2 (NCT01591356), para el tratamiento de pacientes con tumores sólidos avanzados o recurrentes; iExosomes siRNA KRASG12D (NCT03608631), para el tratamiento de pacientes con cáncer de páncreas metastásico con mutación KrasG12D; Silenseed-siG12D-Loder (NCT01676259) y donde se estudia siG12D LODER en combinación con quimioterapia en pacientes con cáncer de páncreas localmente avanzado.

Durante estos años han caído varios siRNAs por falta de eficacia, entre ellos el de Plk1-siRNA (ECOG) suspendido en 2018 por falta de eficacia (El Dika, 2019).



En cuanto a los ASOS existen también varios tratamientos aprobados actualmente por la FDA. El Mipomersen, Fomivirsen y Inotersen usan el mecanismo de degradación de mRNA por la RNase H1 (Yi and Rogge, 2019). El Mipomersen es un GapmeR dirigido al mRNA de la Apo-B-100 para el tratamiento de la hipercolesterolemia familiar. El Fomivirsen fue aprobado en 1998 para tratar la retinitis por citomegalovirus; sin embargo, con las terapias antirretrovirales la retinitis por citomegalovirus ha reducido drásticamente disminuyendo el uso del Fomivirsen. El Inotersen fue aprobada para amiloidosis familiar por mutación de Transtiretina (TTR). Aunque tuvo bastante eficacia, en fase III demostró que tiene efectos secundarios bastante significativos como la trombocitopenia y disfunción renal (Yi and Rogge, 2019).

El Eteplirsén y el Nusinersén son ASO que usan mecanismos dirigidos al procesamiento o splicing de RNA para reducir los niveles del mRNA y su producto proteico que están alterados en una enfermedad debido a una mutación. El Eteplirsén es un oligonucleótido aprobado por la FDA para el tratamiento de la Distrofia muscular de Duchenne que induce la omisión del exón 51 (Levin, 2019; Yi and Rogge, 2019). El Nusinersén es otro oligonucleótido aprobado recientemente por la FDA para la atrofia muscular espinal que actúa por inclusión de un exón alternativo. Este lleva a la producción de una proteína SMN funcional, rescate de neuronas motoras y un desarrollo neuronal más normal (Levin, 2019; Yi and Rogge, 2019).

El Volanesorsén, aprobado para tratar el Síndrome de quilomicronemia fue retirado del mercado por los efectos secundarios severos de trombocitopenia (Yi and Rogge, 2019).

En [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) a fecha de Octubre de 2019, hay varios ensayos clínicos para cáncer como por ejemplo el del ASO contra STAT3 de Astra-Zeneca (NCT01563302), donde se estudia un ASO de nueva generación contra STAT3 (AZD9150) en una población de linfoma no Hodgkin; otro ensayo en espera de resultados es el de Grb2-ASO (NCT01159028), para tratar Leucemia mieloide aguda recurrente en adultos, Leucemia linfoblástica aguda y Síndrome mielodisplásico.

En resumen, poniendo de ejemplo la hipercolesterolemia, una diferente estrategia y gen diana como es el caso del Mipomersen (ASO) y el Inclisiran (siRNA) pueden ser efectivos en esta enfermedad tan prevalente y competir con fármacos biológicos ya aprobados como anticuerpos anti-PKSC9 (Repatha y Revaluent).





#### ***1.4 La división celular: del ciclo celular a la mitosis***

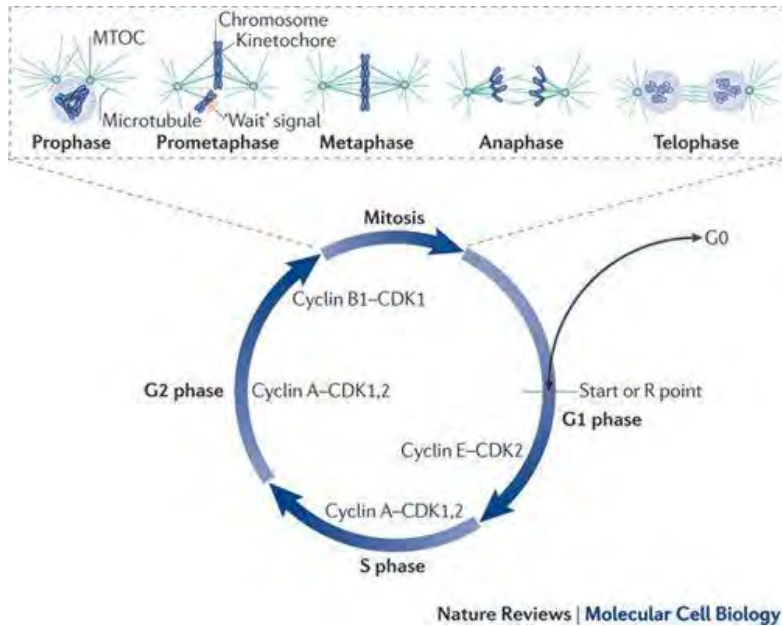
La división celular requiere una cuidadosa organización de 3 eventos principales, la entrada en mitosis, la separación de cromosomas y la citokinesis (Nurse 2000; Morgan 2007). La señalización dentro y entre las moléculas que controlan estos eventos es coordinada por los *checkpoints*. Estos son una clase específica de vías de señalización que garantizan la finalización con éxito de los eventos del ciclo celular. Múltiples *loops* de feedbacks positivos y negativos garantizan que la célula se divida y que los eventos ocurran según un orden apropiado (Malumbres et al, 2009).

El ciclo celular consiste en la síntesis de DNA (S) y la mitosis (M). Estas dos fases son separadas por fases de preparación para cada una de ellas (*gap*) G1–S–G2–M. La división celular implica dos procesos conectados y activados al final de la fase G2, la Mitosis (segregación de los cromosomas que se duplican en la fase S) y la citokinesis (división de la célula). La Mitosis se divide en seis fases distintas (Imagen I. 5):

- Profase: el huso empieza a formarse en el citoplasma y los cromosomas empiezan a condensarse en el núcleo;
- Prometáfase: la envoltura nuclear se rompe y los cromosomas se unen al huso;
- Metafase: los cromosomas se alinean en la zona media del huso;
- Anafase: los cromosomas se mueven a los centrosomas, que forman los polos del huso y en el que el huso se alarga;
- Telofase: la envoltura nuclear se reforma en torno a los nuevos núcleos hijos.
- Las señales durante la telofase desencadenan la citokinesis, que separa los núcleos hijos en dos células hijas.

El *checkpoint* G2/M evita que las células entren prematuramente en la mitosis y, por lo tanto, minimiza el fallo de la segregación de los cromosomas. El *checkpoint* del ensamblaje del huso (SAC, también conocido como el *checkpoint* mitótico) es el principal mecanismo de control del ciclo celular en la mitosis. Es responsable de la producción de células hijas genéticamente idénticas al garantizar la fidelidad de la

segregación de cromosomas. El punto de control posmitótico evita que las células hijas de mitosis anormales ingresen a la siguiente interfase. Todos estos puntos de control son esenciales para reducir la inestabilidad genómica durante la progresión del ciclo celular (Dominguez-Brauer et al, 2015).

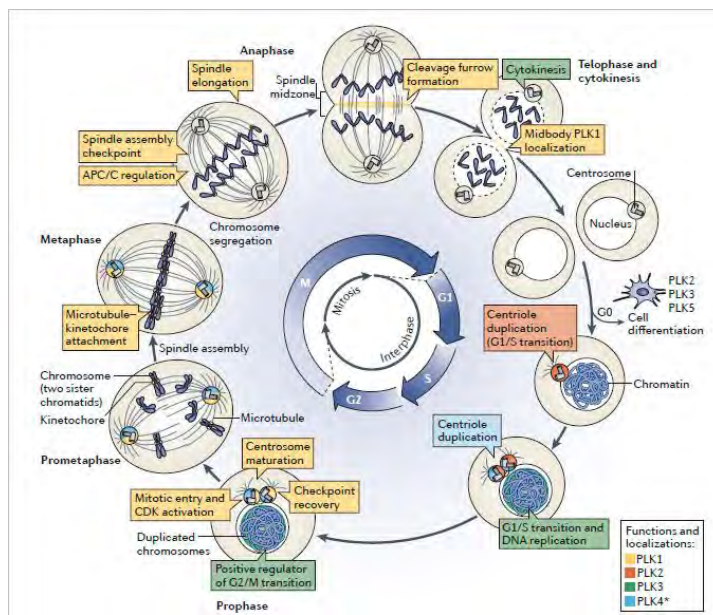


**Imagen I.5. Fases del ciclo celular.** Original a partir de la referencia Pines, 2011. Permitido por Nature Reviews Molecular Cell Biology.

La entrada y salida de la mitosis es coordinada predominantemente por la fosforilación y desfosforilación de miles de proteínas mediante un conjunto de kinasas y fosfatasa de mitosis (Dephoure et al, 2008; Sharma et al, 2014; McCloy et al, 2015).

Durante la entrada en mitosis se activa la quinsa mitotica CDK1 y se inactivan fosfatasa (Alvarez-Fernández et al, 2014). La salida de la mitosis se desencadena por la desactivación de CDK1 y reactivación ordenada de las fosfatasa (Bollen et al, 2009; Barr et al, 2011).

Ya que las proteínas reguladoras que participan en estos mecanismos son controladas por la actividad de kinasas y fosfatasa hay un *feedback* que asegura una respuesta robusta, rápida e irreversible.



**Imagen I.6. Esquema del ciclo celular con sus diferentes etapas.** Adaptado a partir de la referencia Zitouni et al, 2014. Permitido por Nature Reviews Molecular Cell Biology.

Una vez que se activan la entrada y salida de la mitosis, se realizan una serie de eventos previamente programados, llevando la célula hacia la metafase y G1, progresivamente, sin que pueda haber retrasos en condiciones intermedias. Esto se consigue porque los umbrales para las reacciones hacia adelante y hacia atrás son diferentes asegurando la direccionalidad del sistema. Las propiedades que tienen los sistemas *switch* se denominan bioestabilidad. Cada una de las transiciones del ciclo celular es la consecuencia de un circuito de retroalimentación doble negativo por el cual el activador desactiva su

propio inhibidor (Novak et al, 2007; Lindqvist et al, 2009; Domingo-Sananes et al, 2011; Verdugo et al, 2013) (Imagen I. 6).

#### **I.4.1 Entrada en la mitosis y el G2/M *checkpoint***

Los heterodímeros de ciclina/CDK regulan las diferentes transiciones del ciclo celular (Morgan et al 2007). Las ciclinas en asociación con CDK4, CDK6 y CDK2, regulan la entrada en el ciclo celular, los eventos de fase S se regulan por CDK2 y CDK1 mientras que la transición G2 / M están regulados principalmente por CDK1 unida a un miembro de la familia de ciclinas de tipo B. El complejo CDK1-ciclina-B también se conoce como factor promotor de la fase M -MPF.

La acumulación y desaparición periódica de ciclinas tiene un papel central en la regulación de la actividad de CDK1 durante el ciclo celular. CDK1 se mantiene a una concentración constante durante todo el ciclo celular, sin embargo, su activación e inactivación se realiza mediante interacciones con subunidades reguladoras y por la desfosforilación de residuos específicos. La activación de CDK1, que se produce tras la formación de un complejo CDK1 / ciclina B, regula la entrada y la progresión de la mitosis. El complejo CDK1 / ciclina B activo fosforila los sustratos implicados en la degradación de la envoltura nuclear, el ensamblaje del huso mitótico, la condensación del cromosoma y la activación del punto de control del ensamblaje del huso (Hocheegger et al, 2008; Malumbres et al, 2009). En la transición metafase / anafase, el APC ubiquitina las ciclinas de tipo B, que son rápidamente destruidas por el proteosoma. La destrucción de las ciclinas provoca una caída precipitada en la actividad de CDK, entrando las células en G1 (Sacristan et al, 2015).

Una compleja red reguladora controla la actividad de CDK1-ciclina B (complejo factor promotor de la Mitosis- MPF) y lleva a la entrada de la mitosis. Durante G2, las proteínas kinasas de tipo WEE1 y MYT1 (también conocidas como PKMYT1) inhiben la CDK1 al fosforilarla en los residuos Thr14 y Tyr15. Una vez que la actividad de

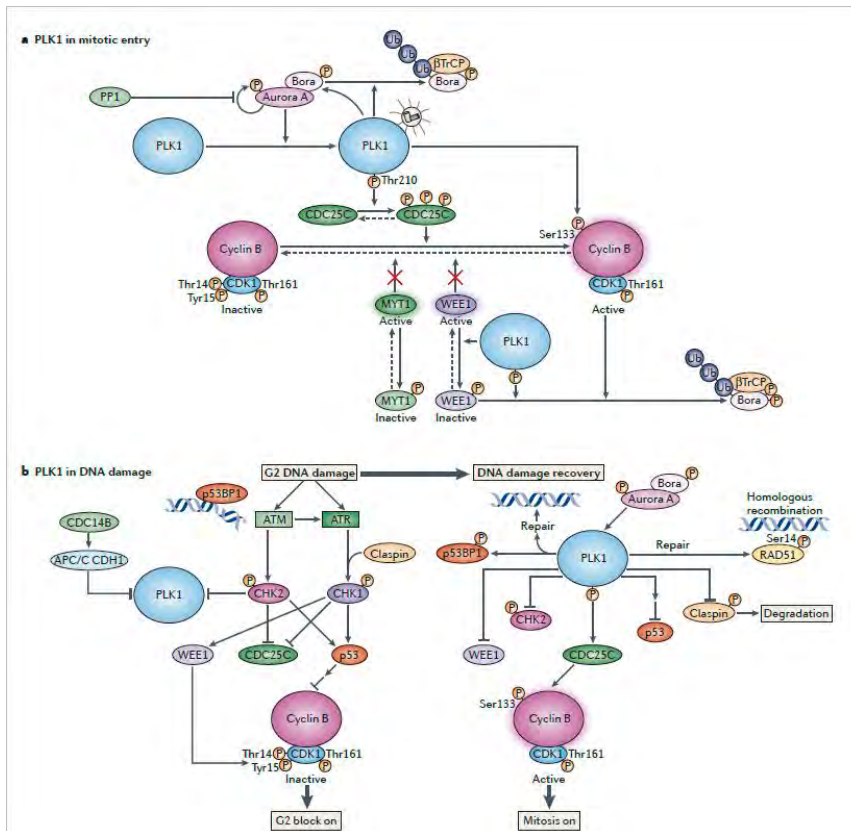
la fosfatasa CDC25C supera los efectos opuestos de WEE1 y MYT1, activa un circuito de retroalimentación positiva (Zitouni et al, 2014).

Polo-like kinase 1 (PLK1) activada a través de la fosforilación de su *T-loop* (Thr210) por Aurora A con su cofactor, la proteína aurora boreal (Bora), activa CDC25C e inactiva WEE1 y MYT1. PLK1 fosforila la ciclina B y desencadena la degradación de Bora y WEE1 a través del reconocimiento de  $\beta$ TrCP (Chan et al, 2008).

PP2A / B55 desfosforila los sustratos de CDK1, pero es contrarrestado por la proteína Ser/Thr kinasa Greatwall (GWL, cuyo gen se denomina *MASTL*) una kinasa que fosforila de forma inhibitoria PP2A / B55 y la mantiene inhibida mientras CDK1 esté activada (Mochida et al, 2010; Gharbi-Ayachi et al, 2010). En la entrada mitótica, la actividad de MPF da como resultado la translocación de ciclina B al núcleo, que es seguida por la activación adicional de MPF y la ruptura de la envoltura nuclear (Imagen I.7a).

PLK1 es necesaria para la entrada mitótica durante la recuperación de la parada en G2 inducida por daño en el DNA. La proteína fosfatasa dual CDC14B (fosfatasa de Ser/Thr pero también de Tyr) activa el componente CDH1 de APC/C (complejo promotor de la anafase/ ciclosoma), que promueve la degradación de PLK1 y la parada del ciclo. En consecuencia, WEE1 se activa y CDC25C se desactiva a través de una cascada de señalización que involucra a las proteínas Ser kinasa ATM y ATR, y a las Ser/Thr proteína kinasa CHK1 y CHK2. ATM y ATR, que son dos kinasas estrechamente relacionadas, inician el *checkpoint* del daño del DNA mediante la fosforilación de varias proteínas clave. Una vez activado, el *checkpoint* lleva a la parada de ciclo celular y a la reparación del DNA o a la apoptosis. ATM se activa mediante roturas de doble cadena y fosforila CHK2, mientras que ATR se activa mediante roturas de una sola cadena y fosforila CHK1. PLK1 inactiva indirectamente la función p53 para controlar la respuesta al daño del DNA. Durante la reparación del DNA, CDK1 se reactiva para permitir la progresión del ciclo celular. PLK1 inicia la reparación mediante la fosforilación de la proteína de reparación del DNA RAD51. Esta desencadena la degradación de WEE1 y claspin conduciendo a la inactivación de CHK1 y CHK2 y promueve la fosforilación de la

proteína p53BP1 que desencadena su disociación del DNA (Bruinsma et al, 2012) (Imagen I.7b).



**Imagen I.7. Entrada de la mitosis (a) y checkpoint G2/M (b).** Adaptado a partir de la referencia Zitouni et al, 2014. Permitido por Nature Reviews Molecular Cell Biology.

## I.4.2 El ciclo del Centrosoma

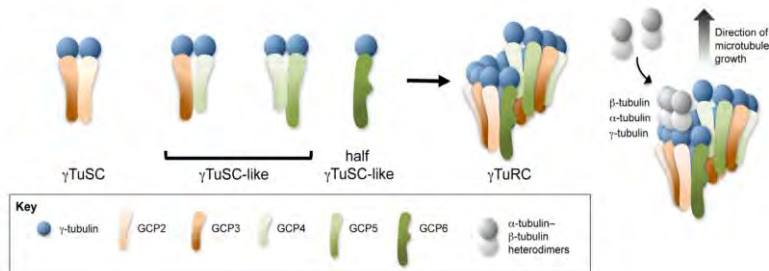
El centrosoma es el principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) en células de vertebrados y consta de dos centriolos rodeados por el material pericentriolar (PCM) (Nigg et al,



2011). La duplicación del centrosoma está estrechamente coordinada con la progresión del ciclo celular, empieza en el límite entre la fase G1/S y ocurre durante la fase S. En la fase G2/M tardía, los centrosomas duplicados se separan para definir los polos opuestos del huso y monitorizar el ensamblaje del huso mitótico para la separación correcta de los cromosomas y el mantenimiento de la estabilidad genómica. (Nigg et al, 2011; Holland et al, 2012). Los ciclos del centrosoma y del centriolo están coordinados con el ciclo celular en todas las especies para garantizar que solo se forme un nuevo centrosoma en cada ciclo.

PLK1 está enriquecido en los centrosomas y es un mediador importante de la maduración, la separación y el desenganche del centriolo del centrosoma (Archambault et al, 2009; Santamaria et al, 2011; Wang et al, 2011; Kong et al, 2014).

Los centriolos y los centrosomas reclutan múltiples factores reguladores y de nucleación de microtúbulos, como la tubulina- $\gamma$  1. La activación de la tubulina- $\gamma$  en el lugar y el momento correctos es crucial para proporcionar la geometría correcta y la regulación oportuna del citoesqueleto (Imagen I.8 y I.9).

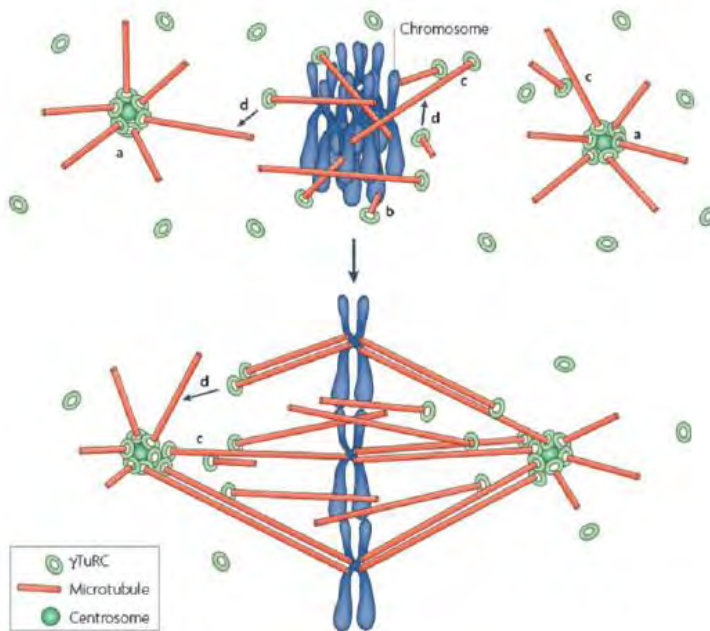


**Imagen I.8. Modelo de ensamblaje del  $\gamma$ TuRC.** Adaptado a partir de la referencia Teixidó-Travesa et al, 2012. Permitido por Journal of Cell Science.

La tubulina- $\gamma$  se ensambla en complejos multisubunitarios con forma de anillo, como el complejo de anillo de tubulina- $\gamma$ ,  $\gamma$ TuRC

(Imagen I.8 y I.9) y sus subcomplejos más pequeños en forma de Y, los  $\gamma$ TuSCs (Teixidó-Travesa et al, 2012).

Estos complejos se componen principalmente de proteínas que contienen dominios GRIP llamados Proteínas Componentes del Complejo tubulina- $\gamma$  o GCPs (GCP2, GCP4, GCP5, etc.).



**Imagen I.9. Modelo de amplificación que explica la función del complejo de anillos de tubulina- $\gamma$  en el huso mitótico.** a) Los microtúbulos son nucleados por el complejo de anillo de tubulina- $\gamma$  ( $\gamma$ TuRC) en los dos centrosomas por su extremo menos y b) cerca de la cromatina mitótica por su extremo más. c) Una tercera vía de nucleación depende de  $\gamma$ TuRC unido a los lados de los microtúbulos de huso existentes. d) El  $\gamma$ TuRC unido a un extremo menos facilita la captura de microtúbulos libres dirigiendo sus extremos a los lados de otros microtúbulos. Adaptado a partir de la referencia Lüders et al, 2007. Permitido por Nature Reviews Molecular Cell Biology.

Otras proteínas necesarias son NEDD1 (también conocida como GCP7 o GCP-WD) y GCP8 (también conocida como Mozart2) NEDD1

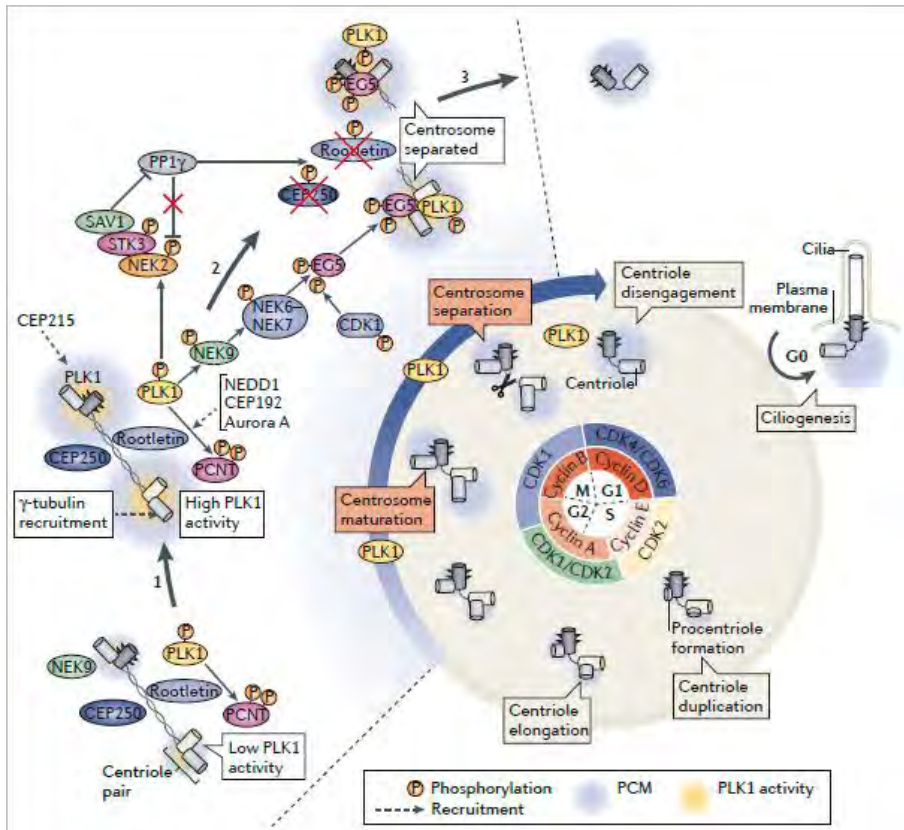


dirige el complejo  $\gamma$ TuRC al PCM y al huso en la mitosis, mientras que GCP8 recluta el  $\gamma$ TuRC al PCM en la interfase (Lüders et al, 2006; Teixidó-Travesa et al, 2010).

PLK1 recluta proteínas PCM que están involucradas en el reclutamiento de tubulina- $\gamma$  y la reorganización del PCM de interfase a mitosis. Entre ellas se incluyen Aurora A y *Centrobin*, así como los sustratos de PLK1, CEP192, Pericentrina, CEP215 (Graser et al, 2007), proteína serina/treonina kinasa NEK9 (Sdelci et al, 2012) y NEDD1 (Haren et al, 2009). La fosforilación de Pericentrina por PLK1 en células humanas es esencial para la maduración del centrosoma de mitosis (Haren et al, 2009; Santamaria et al, 2011; Lee et al, 2011). PLK1 también fosforila la Proteína de Tipo Nineína (*Ninein-like Protein*, NLP), que está involucrada en el anclaje de microtúbulos y la nucleación en la interfase; su fosforilación resulta en su desplazamiento del centrosoma de mitosis (Casenghi et al, 2003).

La proteína CEP250 asociada al centrosoma (*Centrosome-associated protein* CEP250) y Rootletin, conectan entre sí los extremos proximales de los dos centriolos madre desde G1 hasta la entrada mitótica (Bahe et al, 2005). La proteína serina/treonina kinasa NEK2 promueve la separación de los centrosomas a través de la fosforilación de CEP250 y de rootletin, y su consiguiente disociación del centrosoma (Mardin et al, 2011). NEK2 forma un complejo con la proteína serina/treonina kinasa 3 (STK3; también conocida como MST2), con SAV1 y con la proteína serina/treonina fosfatasa PP1 $\gamma$ ; PP1 $\gamma$  contrarresta la actividad NEK2 (Mardin et al, 2010). La fosforilación de STK3 por PLK1 evita la unión de PP1 $\gamma$  al complejo STK3-NEK2, lo que aumenta la actividad de NEK2.

Finalmente, PLK1 dirige la Proteína Motora KIF11/EG5 hacia los centrosomas separándolos. PLK1 y CDK1 activan NEK9, lo que lleva a la activación de NEK6-NEK7, que a su vez fosforila a KIF11 y la localiza en el centrosoma (Smith et al, 2011) (Imagen I.10).

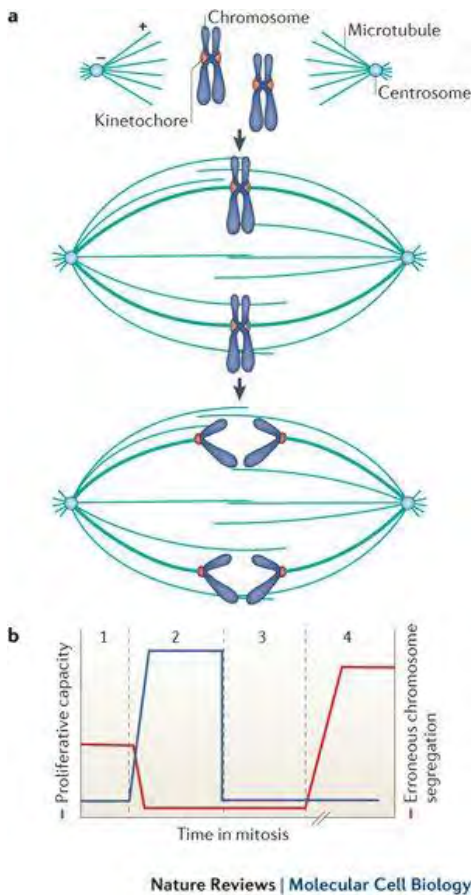


**Imagen I.10. Ciclo del centrosoma.** Adaptado a partir de la referencia Zitouni S et al, 2014. Permitido por Nature Reviews Molecular Cell Biology.

### I.4.3 Los puntos de control molecular de Mitosis: *checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico (SAC); *checkpoint* del complejo promotor de la anafase (APC/C) y el complejo de *checkpoint* mitótico (MCC)

La mitosis asegura la distribución de una copia idéntica del genoma a cada célula hija. En las células eucariotas, las cromátidas hermanas recientemente replicadas se mantienen juntas de la fase S a la

fase M mediante un complejo de varias subunidades llamado Cohesina. En la profase, la mayor parte de la Cohesina es eliminada de los brazos del cromosoma; el resto se eliminará de los centrómeros por la Separasa al inicio de la anafase, permitiendo la separación final de las cromátidas hermanas. La correcta alineación y separación del cromosoma requiere la unión de microtúbulos del huso a los kinetocoros, estructuras que se ensamblan en los centrómeros en la mitosis. (Musacchio et al, 2007).



**Imagen I.11. Velocidad y fidelidad en la división celular.**

**a)** Esquema de la segregación cromosómica. **b)** Diagrama esquemático de la capacidad de proliferación después de la división celular (azul) y los errores de segregación de cromosomas relativos (rojo) en función del tiempo pasado en la mitosis. (1) Cuando el punto de control del ensamblaje del huso (SAC) está inactivo, la salida de la mitosis se produce rápidamente, independientemente de la unión entre microtúbulos y kinetocoro, lo que aumenta la frecuencia de segregación errónea de cromosomas y, por lo tanto, disminuye la capacidad proliferativa. (2) En un ciclo celular no perturbado, se establecen rápidamente en el cromosoma los accesorios adecuados para el huso, lo que permite la salida oportuna de la mitosis. Mientras tanto, el SAC garantiza que la anafase solo ocurra cuando todos los kinetocoros se hayan adherido al eje mitótico por ambos lados. (3) Los aumentos moderados en el tiempo dedicado a la mitosis, que pueden surgir de la actividad de SAC, disminuyen la capacidad proliferativa. Esto puede ocurrir no sólo por defectos en la segregación, sino también por la activación de las vías de respuesta al estrés. (4) Cuando el SAC no puede satisfacerse, por ejemplo, en presencia de fármacos antimitóticos, las células se detienen en la mitosis, seguidas de la detención del ciclo celular o la apoptosis. Adaptado a partir de la referencia Foley et al, 2013. Permitido por Nature Reviews Molecular Cell Biology.

La Mitosis tiene que ser perfecta (fidelidad en la segregación de cromosomas) y al mismo tiempo tiene que ser rápida, ya que las funciones principales de la célula como el tráfico de proteínas, la transcripción, la traducción o la reparación de DNA están suprimidas durante toda la Mitosis (Foley et al, 2013). (Imagen I. 11a).

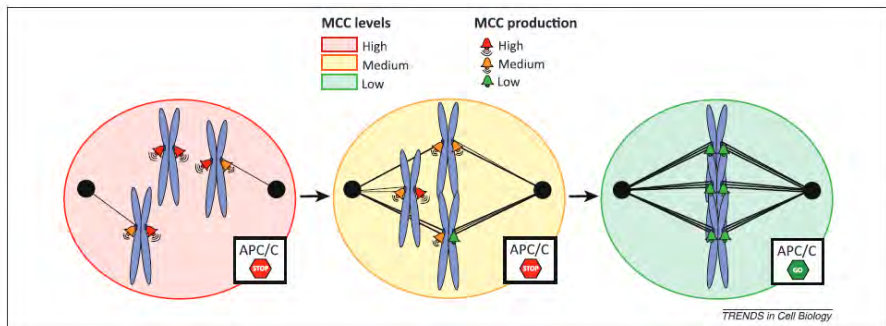
Los retrasos en Mitosis son poco habituales, pero suelen ocurrir en las células cancerosas debido a aberraciones como el número extra de centrosomas (Ganem et al, 2009) o la regulación errónea de la proteína fosfatasa 2A supresora de tumores (PP2A) (Foley et al, 2011). Cada una de esas circunstancias llevaría al retraso de la biorientación y por lo tanto al aumento del tiempo de la mitosis. Incluso un pequeño retraso en mitosis ya puede llevar a una parada del ciclo en la siguiente fase G1.

La velocidad y fidelidad de la segregación de los cromosomas, son responsabilidad, en gran parte, del kinetocoro. Esta estructura es esencial para la activación de SAC en los kinetocoros no unidos, la unión a los microtúbulos del huso, y la extinción de SAC en los kinetocoros unidos (Foley et al, 2013) (Imagen I. 11b).

Además de la activación e inactivación coordinadas de CDK1 que controla la progresión mitótica, la fidelidad del proceso se mantiene mediante un control molecular independiente y conservado en la evolución, conocido como el *checkpoint* del ensamblaje del huso (*Spindle Assembly Checkpoint*, SAC) (Sacristan et al 2015). El SAC es un mecanismo de vigilancia en la transición de la metafase a la anafase que controla la unión de los kinetocoros de cada cromosoma al huso, y detiene la progresión de la anafase hasta que todos los cromosomas se unan correctamente al huso bipolar (Lara-Gonzalez et al, 2012; Sacristan et al 2015). Esta detención se consigue mediante la inhibición de la actividad del Complejo Promotor de Anafase/Ciclosoma (Anaphase-Promoting Complex, o Cyclosome, APC/C), una E3 ubiquitina ligasa de múltiples subunidades que es esencial para la progresión mitótica. Las células normales tienen un SAC robusto en el que uno o más cromosomas no unidos pueden producir una señal lo suficientemente fuerte como para inhibir toda la actividad de APC/C celular y, por lo tanto, bloquear la progresión a la anafase.

Tras la correcta conexión entre el huso de ambos lados y todos los kinetocoros, el SAC se inactiva y CDC20 activa APC/C, E3 ubiquitina ligasa, que conduce a la ubiquitinación y degradación proteolítica de dos sustratos, ciclina B, que mantiene CDK1 activada, y Securina, que inhibe la Separasa. Tras la degradación de la Securina, la Separasa liberada actúa sobre la Cohesina causando la separación de las cromátidas hermanas y el inicio de la anafase. Además, la degradación de ciclina B mediada por APC/C conduce a la inactivación de CDK1 y señala la salida de mitosis (Sacristan et al 2015). Por lo tanto, el SAC está activo por un corto tiempo durante una mitosis normal.

Un solo cromosoma no unido o incorrectamente unido es suficiente para bloquear la progresión a la anafase. Se da inicio entonces a una red de señales para reclutar en los kinetocoros componentes del Complejo de *Checkpoint* Mitótico (*Mitotic Checkpoint Complex*, MCC) que incluyen MAD1, MAD2, BUB1, BUB3, BUBR1, CENP-E y MPS1 (Herzog et al,2009; Sacristan et al, 2015). La agregación de estas proteínas forma el complejo inhibitorio MCC, con el que el SAC inhibe APC/C, así como CDC20, que se enriquece en los kinetocoros que no están unidos (Herzog et al, 2009; Sacristan et al, 2015) (Imagen I. 12).



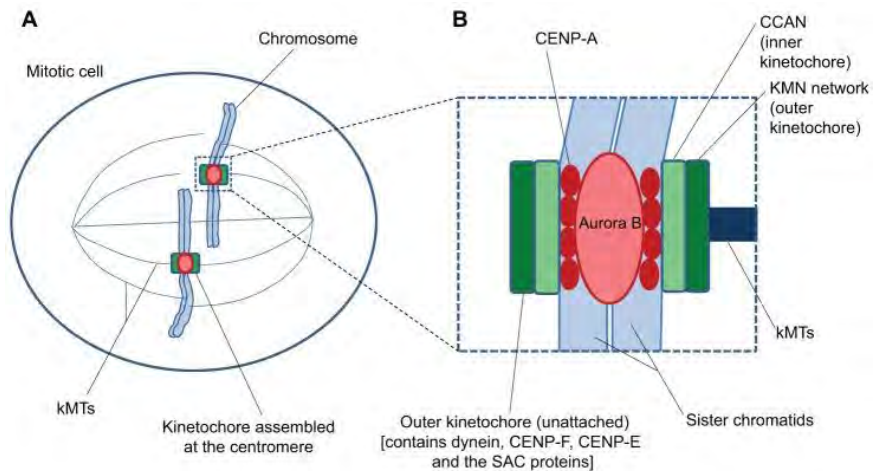
**Imagen I.12. Funcionamiento del *checkpoint* del ensamblaje del huso (SAC).** Cuando los kinetocoros no están debidamente unidos a los microtúbulos, activan la respuesta del SAC (campanas), que culmina en el ensamblaje del Complejo Inhibitorio de *Checkpoint* Mitótico (MCC), el cual inhibe al Complejo Promotor de Anafase/Ciclosoma (APC/C). Original a partir de la referencia Sacristan et al, 2015. Permitido por Trends in Cell Biology.

#### I.4.3.1 Red del complejo KNL1-MIS12 y complejo NDC80 (KMN)

Un kinetocoro humano completamente unido está limitado por aproximadamente 20 microtúbulos. En el modelo de 'césped' recientemente propuesto, cientos de complejos de proteínas cooperan para mantener la unión a los microtúbulos y el kinetocoro humano (Zaytsev et al, 2014) (Imagen I. 14a). La Red Constitutiva Asociada al Centrómero (*Constitutive Centromere-Associated Network*, CCAN), (McAinsh et al, 2001) y la Red proteica KMN (*KMN Network*), integrada por el complejo KNL1-MIS12 y el complejo NDC80 son los dos componentes principales del kinetocoro (Cheeseman et al, 2006). El punto donde el kinetocoro se organiza alrededor de la cromatina viene determinado por la presencia de Histona H3 fosforilada (p-Histone H3) y CENP-A en los nucleosomas exteriores del centrómero (Varma et al, 2012). Hacia fuera, a partir de ahí, encontramos la CCAN compuesta por CENP-C, -H, -I, -K, -L, -M, -N, -O, -P, -S, -T, -U, -W and -X, que se encarga de unir la parte interior del kinetocoro (que es la que se une a cromatina centromérica) con la parte exterior, KMN (que es la que se une al microtúbulo) (Imagen I. 13).

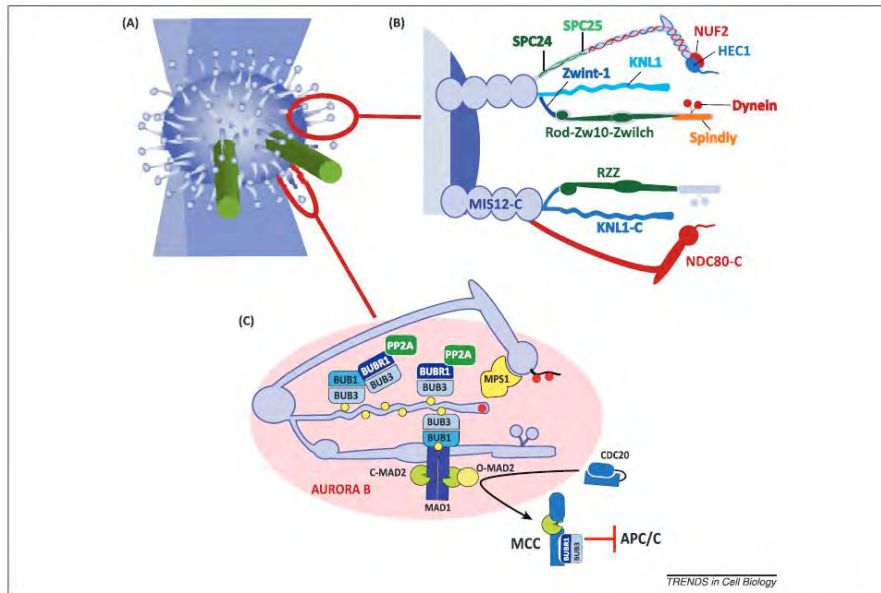
El supercomplejo KMN está formado por tres subcomplejos: KNL1-C (KNL1 y Zwint-1), MIS12-C (NNF1, MIS12, DSN1, y NSL1/MIS14) y NDC80-C (HEC1, NUF2, SPC24 y SPC25) (Foley et al, 2013) (Imagen I. 14b). Esta red es la conexión entre el kinetocoro que contacta con los microtúbulos y la maquinaria de control de mitosis que corrige los errores de conexión huso-cromosomas. Por lo tanto, el sitio de conexión en los kinetocoros está íntimamente conectado con la maquinaria SAC. Esta conexión permite que muchos componentes del SAC puedan cambiar la afinidad por los microtúbulos de la red KMN y mejorar la corrección de errores, asegurando así que esta corrección y las actividades del SAC se coordinen en el espacio y el tiempo.





**Imagen I. 13. Proteínas y estructura de los dominios en las células mitóticas de los kinetocoros de los vertebrados.** a) Los kinetocoros se ensamblan en la periferia de los centrómeros de las cromátidas hermanas en los cromosomas mitóticos y se unen a los microtúbulos del huso. b) Proteínas de los complejos que se localizan en los kinetocoros humanos: KMN, CENP-A, CENP-C, CENP-F, CCAN, *kinase* Aurora B y kMT (*kinetochore microtubule*). Original a partir de la referencia Varma et al, 2012. Permitido por COMPANY OF BIOLOGISTS LTD.

El ensamblaje del MCC está orquestado por la kinasa MPS1, que se asocia con el sub-complejo NDC80-C de la red KMN (Sacristan et al, 2015). A partir de ahí, organiza el reclutamiento de una red interconectada de proteínas SAC que incluye los componentes: BUB1, BUB3, MAD1, MAD2 y BUBR1. MAD2, BUB3 y BUBR1 constituyen el efector final de del MCC, y su ensamblaje correcto depende de BUB1 y MAD1, junto con algunas proteínas auxiliares adicionales (Murray, 2011, Vleugel et al, 2012).



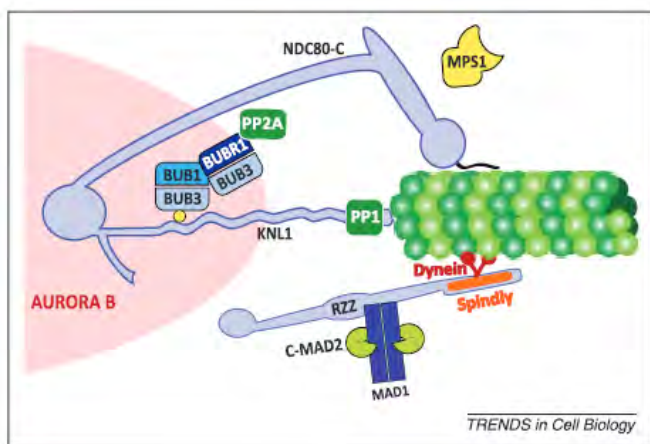
**Imagen I.14. Señalización del SAC en la red KMN.** a) El kinetocoro exterior con los complejos del KMN, que cooperan para establecer interacciones con los microtúbulos. b) Complejo de red KMN comprende los tres subcomplejos: KNL1-C, MIS12-C y NDC80-C. c) Ensamblaje de complejos de las proteínas del SAC en la red KMN. Original a partir de la referencia Sacristan et al, 2015. Permitido por Trends in Cell Biology.

El ensamblaje del MCC recibe ayuda de la actividad kinasa Aurora B, que regula la unión de MPS1 a NDC80-C mientras contrarresta la unión de PP1 a KNL1. Aurora B además fosforila la cola de HEC1 para disminuir la afinidad de unión a los microtúbulos de NDC80-C. MPS1 fosforila, entre otros, KNL1 y BUB1 para reclutar a los BUB (BUB1 / BUB3 / BUBR1) y MAD1-MAD2, respectivamente. MAD2 puede presentar dos tipos de conformación: en los kinetocoros que no han unido microtúbulos está en forma Open, O-MAD2; pero se convierte en Closed, C-MAD2, cuando se une a CDC20 para exponer un sitio de unión para BUBR1, eventualmente resultando en la producción final del MCC y la inhibición de APC/C. BUBR1 a su vez recluta la fosfatasa PP2A-B56, cuya actividad promueve la estabilidad



de las interacciones kinetocoro-microtúbulos mediante la desfosforilación de las dianas de Aurora B en la red KMN (Sacristan et al, 2015) (Imagen 14a e Imagen 14c).

Al complejo MIS12, MIS12-C, se le llama la piedra angular del kinetocoro exterior, ya que sobre él se arma todo el entramado de la red KMN, conectando el kinetocoro interno con KNL1-C y NDC80-C, que a su vez se extienden al citosol para contactar directamente con los microtúbulos (Varma et al, 2012; DeLuca et al, 2012; Foley et al, 2013) (Imagen 14a e Imagen I.14b). NDC80-C interactúa con los microtúbulos a través de su unión a la interfaz entre dos subunidades de tubulina (Foley et al, 2011). Para esto, utiliza los dos dominios globulares CH presentes en los extremos N-terminal de HEC1 y NUF2, y la cola N-terminal de 80 aminoácidos de HEC1 conocida como “*the tail of the tail*” (DeLuca et al, 2012). Ese extremo del NDC80-C es el objetivo clave de la maquinaria de corrección de errores. Por una parte, la fosforilación múltiple de HEC1 por Aurora B crea repulsión electrostática entre la cola y el microtúbulo y, por lo tanto, disminuye la afinidad de unión de los microtúbulos de los kinetocoros (Carmena et al, 2012; Foley et al, 2013). Por otra parte, la región de la hélice superenrollada que sigue el dominio CH en HEC1 se interrumpe por un *loop* que está involucrado en el reclutamiento de múltiples factores que ayudan en la formación de interacciones estables de kinetocoro-microtúbulos como por ejemplo el complejo SKA (Espeut et al, 2012; Nilsson, 2012). El tercer componente, KNL1-C, también muestra afinidad por los microtúbulos, a través de un *basic patch* o *stretch* de 9 aminoácidos en el extremo N-terminal de KNL1 (McClelland et al, 2003; Caldas et al, 2014). (Imagen I.14). KNL1 desempeña un papel fundamental como *scaffold* para el ensamblaje de módulos de señalización SAC y la corrección de errores. Finalmente, a través de una región hélice superenrollada C-terminal, KNL1 interactúa con Zwint-1, que recluta el complejo RZZ y Spindly encargados de enganchar al complejo motor dineína-dinactina a proteínas del kinetocoro como MAD1-MAD2 (Karess et al, 2005; Gassmann et al, 2010; Kiyomitsu et al, 2011; Varma et al, 2012) (Imagen I.14 y I.15).



**Imagen I.15. Silenciamiento del SAC en los kinetocoros.**  
Original a partir de la referencia Sacristan et al, 2015. Permitido por Trends in Cell Biology.

#### I.4.3.2 El complejo pasajero cromosómico: *chromosome passenger complex, CPC*

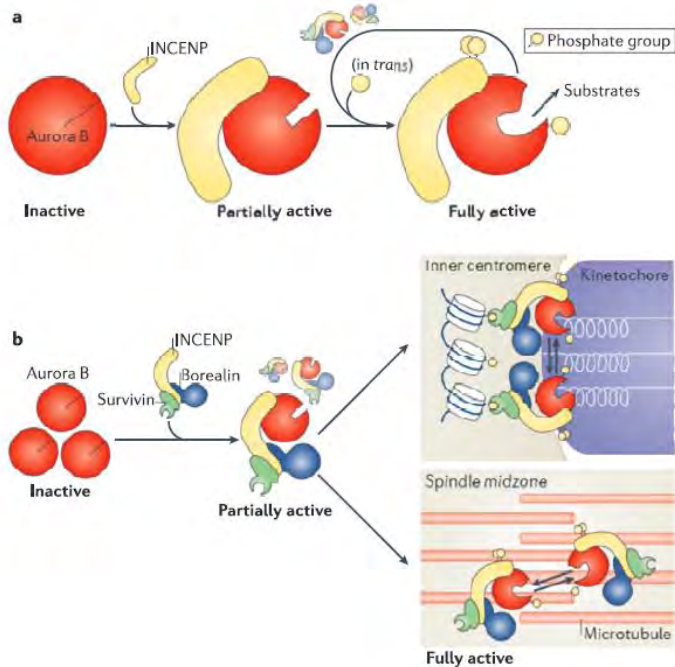
Apesar del alto grado de especialización del SAC, éste no es capaz de reconocer las uniones erróneas entre el kinetocoro y los microtúbulos. Sin embargo, estas últimas pueden arreglarse gracias a la actividad del complejo CPC. La localización dinámica de las proteínas pasajeras cromosómicas en el tiempo y el espacio adecuados avanza las conexiones moleculares durante la segregación de cromosomas y la citokinesis (Carmena et al, 2012). Estos dos eventos pueden ser organizados por un conjunto de reguladores, que se localizan en el cromosoma mitótico antes de su segregación, pero que luego se transfieren al ecuador celular para la citokinesis (Earnshaw et al, 1991).

Actualmente se reconoce que el CPC está compuesto por el núcleo enzimático Aurora B kinasa, la proteína estructural o *scaffold* Inner Centromeric protein o INCENP y otras dos subunidades no enzimáticas Survivin / BIRC5 y Borealin / CDCA8 (Carmena et al, 2012) (Imagen I.16). Aurora B interactúa con la región C-terminal de

INCENP llamada dominio de IN-box. Los residuos N-terminales 1–58 que contienen la caja CEN de INCENP forman un paquete de triple hélice con Borealin y Survivin que se requiere para la localización de CPC primero en el centrómero interno, luego en la zona media del huso y finalmente en el cuerpo medio (*midbody* de Anafase/Telofase) (Jeyaprkash et al, 2007). La actividad de la kinasa Aurora B también se requiere para forzar que el CPC se localice en el centrómero interno y el ecuador celular (Qian et al, 2013).

Los cambios en la localización de CPC en diferentes etapas de la mitosis y la citokinesis proporcionan un medio eficaz para restringir la fosforilación de sus sustratos al tiempo y espacio apropiados durante la progresión mitótica (van der Horst et al, 2014). A partir de la entrada en la mitosis, el CPC se acumula en los centrómeros internos, que es un requisito previo para establecer una unión funcional de los microtúbulos a los cromosomas mitóticos mediante la desestabilización de la unión kinetocoro-microtúbulos errónea, activando el punto de control del conjunto del eje mitótico (SAC) hasta que se realice la conexión del eje bipolar y promueva la concentración de los cromosomas en la placa metafásica. (Funabiki et al, 2013).

Tras la transición de la metafase a la anafase, el CPC se traslada de los cromosomas de anafase al ecuador celular donde promueve el inicio y la invaginación del surco de escisión de la membrana, la formación y la estabilización de la zona ecuatorial del huso (extremos más de los microtúbulos centrales antiparalelos) y el acortamiento axial de los brazos del cromosoma segregado cerca de la escisión.



**Imagen I.16. Acoplamiento de la activación de la kinasa Aurora B con la formación del CPC y su localización. a)** La activación de Aurora B necesita de la unión de INCENP al centrómero: una vez unida, Aurora B se autofosforila y fosforila y activa INCENP mediante un *loop* de retroalimentación. **b)** El complejo CPC funcional está compuesto por INCENP, Survivin y Borealin que se unen a las histonas del centrómero y a los microtúbulos del huso mitótico central durante el inicio y final de la mitosis respectivamente. Original a partir de la referencia Carmena et al, 2012. Permitido por Nature Reviews Molecular Cell Biology.

El CPC también controla el momento del reensamblaje de la envoltura nuclear (*Nuclear Envelope Reassembly*, NER) en la telofase y, finalmente, en la parte central del *midbody*, el CPC controla la construcción y regulación del anillo contráctil en el momento de la

abscisión que completa la citokinesis (Kitagawa et al, 2013; Afonso et al, 2014; Thoresen et al, 2014).

#### **I.4.4 Salida de la mitosis y citokinesis**

##### **I.4.4.1 Salida de la mitosis**

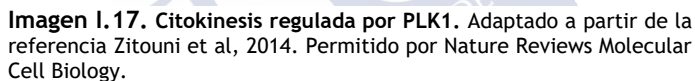
Después de terminar la anafase, los eventos de fosforilación de CDK1 que establecieron la entrada de la mitosis se invierten y la célula vuelve a un estado de interfase en un proceso conocido como salida mitótica (*mitotic exit*) (Clifford et al, 2008; Rieder, 2011; Wurzenberger and Gerlich, 2011). La degradación de la ciclina B mediada por APC/C produce una caída en la actividad de CDK1, pero no hay una reactivación inmediata de las fosfatasas que contrarrestan CDK1. La desfosforilación coordinada y oportuna de la gran cantidad de sitios de fosforilación mitótica es crucial para la ejecución de esta transición compleja a través del proceso de salida mitótica. Los ejemplos mejor entendidos de fosfatasas de salida mitótica son PP1 y PP2A / B55 (Grallert et al, 2015). La PP1 estaba inhibida directamente por CDK1 por la fosforilación del residuo T320, y su reactivación por auto-desfosforilación juega un papel crítico en el inicio de la salida mitótica. Ya que este sitio se desfosforila por la propia PP1, la desfosforilación completa de T320 podría lograrse simplemente mediante cambios en el equilibrio de la actividad kinasa (CDK1) / fosfatasa (PP1) debido a una caída en los niveles de ciclina B por debajo de un umbral crítico. PP1 después desfosforila y desactiva Greatwall, lo que permite a PP2A / B55 desfosforilar a sus inhibidores, ARPP19 y Ensa, y reactivarse (Heim et al, 2015; Ma et al, 2016). PP1 también puede contribuir directamente a la activación de PP2A / B55, pero esto queda por confirmar en células de mamíferos (Grallert et al, 2015). Fcp1 también se ha implicado en este mecanismo al contribuir directamente a la desfosforilación de Greatwall (Della Monica et al, 2015). La interacción precisa de PP1, PP2A/B55, Fcp1 y otras fosfatasas que pueden contribuir a la salida mitótica necesita estudios cuantitativos más precisos para ser mejor entendida (Hégarat et al, 2016). El proceso de salida mitótica está íntimamente conectado a la etapa final de la división celular, la citokinesis.

#### I.4.4.2 Citokinesis

Al igual que otras transiciones del ciclo celular, la degradación de la proteína diana desempeña un papel importante en el control de la salida mitótica y la citokinesis. Durante la mitosis, esto se lleva a cabo mediante la ubiquitina ligasa APC/C, que reconoce sustratos junto con dos proteínas adaptadoras, CDC20 y CDH1 (Peters et al, 2006). Se sabe que APC/C ubiquitina a PLK1 para su degradación durante la anafase, y si se interfiere con este proceso se previene la salida mitótica normal y la citokinesis (Visintin et al, 1997; Lindon et al, 2004).

Los componentes de la maquinaria de citokinesis se secuestran en el núcleo de las células al final de la fase S y antes de la ruptura de la envoltura nuclear. Luego, a medida que las células entran en la mitosis, la fosforilación de CDK1 mantiene inhibidos a muchos de los actores clave, evitando que se formen complejos que promuevan la citokinesis. Al inicio de la anafase, estas fosforilaciones inhibitorias se eliminan como ya hemos dicho al caer la actividad CDK1 y aumentar la de las fosfatasas, y se produce una segunda ronda de fosforilación de proteínas mediada por las kinasas de la familia Polo y Aurora. Estas fosforilaciones específicas de la anafase promueven el ensamblaje de complejos de proteínas requeridos para la citokinesis. Finalmente, muchas de estas proteínas se degradan, lo que limita su acción a una vez por cada ciclo celular (Barr et al, 2007).





107

2013) y PRC1 (*Protein regulator of cytokinesis 1*) (van Vugt et al, 2005; Bruinsma et al, 2012 ).

Los microtúbulos estimulan la fosforilación de PRC1 mediada por PLK1 en T602 en metafase, que mantiene inhibida PRC1 y previene la formación prematura de la zona media (Neef et al, 2007; Hu et al, 2012). La fosforilación de PRC1 en T602 también crea un sitio estable para PLK1 por el que ésta se une en el ecuador del huso (Neef et al, 2007). Se demostró que PLK1 fosforila los componentes del complejo central del huso RACGAP1 (*Rac GTPase-activating protein 1*) y MKLP1/KIF23, promoviendo así el reclutamiento de ECT2 (factor intercambiador GDP por GTP sobre proteínas GTPasas pequeñas tipo Rho) a la zona media del huso durante la anafase, a través de sus dominios C-terminal BRCA1 (BRCT) de unión a fosfopéptidos. Aquí, ECT2 promueve la activación de la GTPasa RHOA, que impulsa la formación del surco de escisión a partir de la membrana plasmática y la formación de anillo contráctil de actina (Petronczki et al, 2008). Al fosforilar el factor de abscisión CEP55, PLK1 evita su reclutamiento en el ecuador y su interacción con MKLP1; por lo tanto, solo cuando PLK1 se degrada, CEP55 puede ser dirigido a la parte media del *midbody*, donde promueve la abscisión (Bastos et al, 2010).

Muchos otros estudios, incluido el análisis específico del proteoma del *midbody*, junto con el trabajo sobre el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte de proteínas entre huso/citoesqueleto y membrana (ESCRT), el complejo *Exocyst*, las GTPasas Rab11 y Rab35, el tráfico secretor, el citoesqueleto y los lípidos han demostrado que para que ocurra la citokinesis se necesitan una serie de eventos complicados y altamente orquestados (Gromley et al, 2005; Eggert et al, 2006; Chesneau et al, 2012; McCullough et al, 2013; Bhutta et al, 2014; Storck et al, 2018; Mei et al, 2018). La descripción molecular de dichos eventos supera el ámbito de esta tesis.



## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





Los carcinomas diferenciados del epitelio folicular de la glándula tiroides se han convertido en uno de los cánceres más frecuentes en mujeres. En este tipo de tumores la terapia suele ser efectiva, aunque ningún paciente puede darse por curado debido a la posibilidad de persistencia o recurrencia del tumor hasta muchos años después. Frente a este grupo numeroso, pero bien controlado, existen los carcinomas avanzados de tiroides, que incluyen los carcinomas diferenciados que recurren, los carcinomas pobremente diferenciados, y los carcinomas anaplásicos. Estos últimos constituyen una enfermedad huérfana (Orphanet, ORPHA:142) ya que suponen un número muy pequeño de casos, con un pronóstico letal en pocos meses. Sólo hay un tratamiento aprobado específicamente dirigido a esta enfermedad, el Dabrafenib + Trametinib, pero sólo para aquellos casos que tengan mutado BRAF y su eficacia aún está en evaluación. Los otros tratamientos vienen del uso compasivo individual de tratamientos descubiertos para otros cánceres, en pacientes que han recibido varias modalidades terapéuticas muy agresivas en poco tiempo, sin que pueda haber un ensayo clínico controlado ante la escasez de pacientes vivos.

Los cultivos celulares han sido una fuente de aprendizaje sobre los mecanismos moleculares del cáncer humano, la búsqueda de dianas terapéuticas y la comprobación inicial de si un nuevo tratamiento podría ser un anticanceroso efectivo. Sin embargo, al volverse la metodología de cultivo una técnica de uso masivo y con la obtención de líneas celulares inmortales derivadas de pacientes se le prestó muy poca atención a los componentes y la técnica en sí de cultivo. Esto provocó una pérdida del fenotipo y del comportamiento propio de la célula de origen, algo característico de las líneas celulares comerciales.

Las células creciendo *in vitro* en un medio rico en factores de crecimiento y hormonas se dividen espontáneamente, sea cual sea su origen, normal o canceroso. Por tanto, hay dos variables intrínsecamente mezcladas en una línea celular cancerosa *in vitro*: que es cancerosa y que se divide. Eso hace que la mayoría de las nuevas moléculas testadas *in vitro* y de los mecanismos moleculares o dianas descubiertos en líneas celulares o cultivos primarios cancerosos de pacientes, no sean efectivos cuando se prueban en pacientes *in vivo*.

Nuestra idea es que, si comparásemos células normales o tumorales benignas con células de carcinomas, incluso del mismo paciente, todas creciendo en las mismas condiciones *in vitro*, las diferencias que obtuviésemos serían específicas del cáncer, evitando de esta forma el resto de variables comunes a cualquier célula que se divida. Para ello, hemos desarrollado una metodología de cultivo, h7H, que permite el crecimiento durante al menos veinte pases de células de epitelio folicular normales, de enfermedades benignas, carcinomas diferenciados y carcinomas anaplásicos. Las condiciones h7H permiten mantener el fenotipo de tiroides, estudiado con marcadores característicos en las células normales y carcinomas diferenciados. También mantiene respuestas funcionales características como la respuesta diferencial al TGF beta en células normales frente a células diferenciadas.

En estos cultivos todas las técnicas tienen que ser adaptadas a micro-métodos, ya que se comienza con muy pocas células en el sembrado inicial. Nuestra idea es que aplicando técnicas masivas diferenciales, con una potente estadística, podríamos obtener dianas terapéuticas no conocidas para el carcinoma de tiroides humano.

Por todo ello, en el presente trabajo de tesis doctoral se han planteado los siguientes **OBJETIVOS**:

1. Comparar células de tiroides humano obtenidas de carcinomas con células foliculares, ambas creciendo en cultivo en las mismas condiciones h7H y hacer un estudio de proteómica diferencial. Seleccionar la mejor proteína candidata por criterios estrictos, entre los que se incluye que tenga significación estadística, que no haya sido estudiada previamente en cáncer de tiroides y cuya función sea desconocida.
2. A partir de nuestro banco de tejidos, explorar la expresión de la proteína candidata diferencialmente expresada en cultivos cáncer de tiroides, tanto en expresión de RNA como de proteína por inmunohistoquímica.
2. Investigar el potencial terapéutico de la proteína candidata diferencialmente expresada en cáncer de tiroides. Para ello, se diseñarán secuencias antisentido que repriman su expresión y se medirá si dicha represión tiene un efecto antitumoral (anti-proliferativo/pro-muerte celular).
3. Investigar la función de la proteína candidata diferencialmente expresada en cáncer de tiroides. Para ello se validarán anticuerpos específicos y se emplearán técnicas celulares y moleculares que aporten información funcional.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**







### ***III. 1 Aspectos éticos:***

Este estudio de tesis doctoral ha utilizado muestras de tejido humano normal y tumoral de la colección TIROCHUS incluida con el nº c.0003960 en el Registro Nacional de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III y depositada en el Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). La utilización de estas muestras cuenta con la evaluación positiva, códigos de registro 2015/238 y 2016/239, del Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia (CAEIG) y los consentimientos informados.

Los procedimientos realizados con animales fueron llevados a cabo bajo la supervisión del Comité bioético de la Universidad de Santiago de Compostela (procedimiento de la Profesora Clara Álvarez Villamarín: 15003/14/005).

Dichas investigaciones autorizadas se encuadran en los proyectos de investigación nacionales ISCIII PI15/01501 (IP Dr. José Manuel Cameselle Teijeiro) y BFU2016-76973-R (IP Dra. Clara Álvarez Villamarín).

### ***III. 2 Declaración de conflictos de interés***

Declaro que soy co-titular de la siguiente patente, desarrollada en el contexto de esta tesis de doctorado: “Compuestos y métodos para el tratamiento del cáncer”, P20193074, presentada el 13 de agosto de 2019 ante la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM).

### ***III. 3 Cultivos Celulares***

#### **III.3.1 Cultivos primario de células foliculares**

El cultivo se realiza con un sistema protocolizado de forma estricta, para evitar contaminaciones bacterianas, fundamentalmente micoplasmas (Bravo et al, 2013; Garcia-Rendueles et al, 2017). Los patólogos que colaboran en el proyecto reciben alícuotas de medio cultivo h7H (descrito en la Tabla III.1), estériles y selladas, que se mantienen refrigeradas en nevera. El patólogo principal (Dr. José M.

Cameselle-Teijeiro) selecciona en los excedentes de tejido de la pieza quirúrgica los fragmentos de tumor (T) o de tejido normal (N) bajo campana horizontal, y los introduce en las alícuotas de medio de cultivo a temperatura ambiente.

Una vez ya en el laboratorio el tejido se divide en dos partes dentro de la habitación de cultivos humanos y campana de flujo laminar de clase IIB:

1. Porción para guardar en fresco congelado: esta parte se guarda en *RNA Later* (AM7024, Invitrogen) en un tubo eppendorf debidamente etiquetado y se le somete a un proceso de congelado secuencial:
  - \* 24h a 4°C
  - \* 24h a -20°C
  - \* Permanentemente a -80°C
2. Porción para realizar el cultivo primario. Este trozo se tritura lo máximo posible con la ayuda de un bisturí y se pasa a un tubo con PBS (P3813-10PAK, Sigma-Aldrich) enriquecido con 1% de Glucosa (D9434-250G, Sigma-Aldrich); esto se hace para eliminar los posibles restos de medio de cultivo o sangre. Se centrifuga a 300g durante 5min. Una vez centrifugado se retira el sobrenadante y se le añade la mezcla de dispersión que consiste en:
  - \* 1mg/mL de Colagenasa tipo IV (C5138-1G, Sigma-Aldrich)
  - \* 1X de Tripsina (T4674-100mL, Sigma-Aldrich)

Se utiliza 1mL de mezcla por mg de tejido, aproximadamente. Esta mezcla de dispersión debe prepararse en el momento en que se va usar, de la siguiente forma: se pesa la Colagenasa, en torno a 12mg, se resuspende en 10,8 mL de PBS y se filtra por un filtro de 0,22µm (SLGP033RB-Millex-GP, Millipore), a este filtrado se le añaden 1,2mL de Tripsina 10X.

El tejido en la mezcla de dispersión se incuba durante 45min a 37°C, agitando en varias ocasiones con la pipeta para favorecer la dispersión mecánica.

Una vez pasado este tiempo, la mezcla se pasa por un filtro (SX0002500 Millex, Millipore) con una malla de nylon de 417 m (NY41000010 Millex-GP, Millipore) y se mezcla con medio de cultivo enriquecido con suero para que se neutralice la tripsina.

Se centrifuga a 300g 5min, se retira el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 2mL de medio h7H completo y que incluya 107M de ROCK-inhibitor (Y-27632 dihydrochloride, Centaur Europe). La suspensión celular se siembra en un pocillo de placas de multipocillo de 12 (COSTAR 3513, Corning) debidamente rotulado; el tubo de las células se lava con un tercer mL que se añade también al pocillo.

Los cultivos primarios son cultivados en el medio de cultivo “h7H” estandarizado por nuestro grupo (Bravo et al, 2013; García-Rendueles et al, 2017) (Tabla III.1). Este es un medio humanizado, en el que se mantienen las concentraciones de siete grupos de aditivos (Hormonas, Transferrina, Yodo, Oligoelementos, Antioxidantes, Metabolitos y Etanol) en rangos de normalidad de suero humano. La base del medio es Medio Coom's modificado preparada especialmente para nosotros por Sigma-Aldrich-USA (*Custom-made*) sin rojo fenol para que podamos añadirlo o quitarlo según convenga. A ello se le añade suero (5% FCS, 5% NCS), antibióticos (penicilina y estreptomicina) y glutamina extra por su baja vida media (García-Rendueles et al, 2017).

Las células crecen hasta llenar el pocillo de MW12. A partir de ese momento, se lavan dos veces las células con PBS y se añade 0,5 mL de tripsina-EDTA 1X (59418C, Sigma-Aldrich) durante 5 minutos en el incubador a 37° C. Se despegan las células, se recogen en un contenedor universal de 25 ml, se lava bien el pocillo con medio h7H completo, y se centrifugan 5 minutos a 300g. Se resuspenden en el medio adecuado para hacer una dilución 1:2.

A partir de ahí, se mantienen en dilución 1:2 bien aumentando el número de pocillos del mismo tamaño, bien aumentando el tamaño del plato donde se siembran.

**Tabla III.1. El medio de cultivo “Humanized Seven Homeostatic Additives” h7H (Bravo et al, 2013).**

HUMANIZED SEVEN HOMEOSTATIC ADDITIVES (h7H) MEDIUM				
h7H MIX (concentrations per Liter)				
Group of Additives	Species	Brand	Final Concentration	Reference values in human serum (Mayo Clinic Medical Laboratories)
1.-Osmolality & ions: Final Osmolality of the fully prepared h7H			284.67 mOsm/kg	275-295 mOsm/kg
Na+	Included in customer designed Modified F-12 Coon's		147.27 milimol/L	135-145 mmol/L
K+	Included in customer designed Modified F-12 Coon's		4.18 milimol/L	3.6-5.2 mmol/L
Other Ions	Included in customer designed Modified F-12 Coon's			
Bicarbonate		S8875-SIGMA	1.68 g/L	22-29 mmol/L
Apotransferrin	Human, 0% Fe saturation	T5391-SIGMA	1mg/L	1.9-3.6g/L (40% Fe Saturation)
BSA (AlbuMAX® II)	Bovine	11021-037-GIBCO	1%	
2.-Hormones				
TSH	Bovine	T8931-SIGMA	40miliU/L	0.3-5 miliU/L
Insulin	Human, recombinant from yeast	I2643-SIGMA	12.5miliU/L	8/11 milliU/L
Somatostatin	Human	S9129-SIGMA	50 nanog/L	25 nanog/L
GH	Human	PFIZER Genotonorm MiniQuick	0.20mcg/L	Adults: Males: 0.01-0.97mcg/L Females: 0.01-3.61mcg/L
Cortisol		H0888-SIGMA	23 nanoM	am: 7-25 mcg/dL pm: 2-14 mcg/dL
3.-Metabolites				
Sodium Pyruvate		P5280- SIGMA	220mg/L	7-14mg/L
Amino Acids	Included in customer designed Modified F-12 Coon's			
Glucose	Included in customer designed Modified F-12 Coon's		1638mg/L	70-140 mg/dL
Lipids	Included in customer designed Modified F-12 Coon's			
Other Metabolites	Included in customer designed Modified F-12 Coon's			
4.-Antioxidants & Vitamins				

(+) -Sodium L-Ascorbate	Included in customer designed Modified F-12 Coon's		15mg/L	6-20mg/L
		A4034-SIGMA	1mg/L	
L-Glutathione Reduced		G6013-SIGMA	0.2mg/L	2mg/L (6.2 mcmol/L) Witschy A et al, 1992
DL $\pm$ -a-Tocopherol (vit E)		T3251-SIGMA	0.5mg/L	5.5-17.0 mg/L
DL-a-Tocopherol acetate		T3376-SIGMA	0.5mg/L	1mg/L Concentration in B27 supplement
Vitamins	Included in customer designed Modified F-12 Coon's			
5.-Iodine				
Nal		S8379-SIGMA	10mcg/L	40-92 mcg/L
6.-Oligoelements				
Sodium Selenite		S5261-SIGMA	75 mcg/L	70-150mcg/L
Zinc	Included in customer designed Modified F-12 Coon's			
Iron	Included in customer designed Modified F-12 Coon's			
7.-Ethanol				
Ethanol (Final concentration contribution from groups 1 & 6)			0.0177%	<10 mg/dL
OTHER COMPONENTS				
SERA				
Fetal Bovine Serum (FBS)	Bovine	10270-GIBCO Origin: South America EU Approved Origin	5%	
Newborn Calf Serum (NCS)	Bovine	16010-GIBCO Origin: New Zealand EU Approved Origin	5%	
ANTIBIOTICS				
Penicillin-Streptomycin		P4333-SIGMA	100 IU/mL	
Amphotericin B		A9528-SIGMA	2.5 nanog/mL	

Los cultivos se caracterizan de forma rutinaria mediante el estudio de la expresión de marcadores fenotípicos a lo largo de los pases (TTF1/NKX2-1, PAX8, Tiroglobulina, Tiroperoxidasa, NIS y Pendrina). Las técnicas empleadas son de rutina en el laboratorio bien

expresión de RNAs por qRT-PCR (SybrGreen, TaqMan), bien de las proteínas por inmunocitoquímica o inmunofluorescencia; y en algún caso proteína por western. En cultivos normales seleccionados y en todos los cancerosos y sus parejas de normalidad se hace genotipado mediante por STRs para comprobar que las parejas vienen del mismo órgano inicial (ver apartado III.8.3).

### III. 3.2 Cultivo de líneas celulares comerciales

La baja incidencia de los carcinomas anaplásicos hace que dispongamos de muy pocos cultivos primarios de esta patología lo que nos llevó a realizar los experimentos en líneas celulares comerciales.

Para saber si nuestras líneas celulares son un buen modelo representativo de lo que pasa en el paciente se hizo un análisis *in silico* a nivel genómico, usando varias bases de datos, entre ellas Cellosaurus (v31) (Bairoch, 2018; <https://web.expasy.org/cellosaurus/>). Se han adquirido líneas celulares comerciales con cuidado de seleccionar líneas que estuvieran certificadas por el *International Cell Line Authentication Committee* (ICLAC) y confirmadas como células de originales de tiroides humano, no contaminadas con otras líneas ni que figuren en su *Register of Misidentified Cell Lines* (v9) (Capes-Davis et al, 2010; <https://iclac.org/databases/cross-contaminations/>). Se caracterizaron en nuestro laboratorio tanto los STRs para asegurar que el perfil genético coincidiese con el de las bases de datos, como las mutaciones conocidas más características.

Se compraron 6 líneas celulares comerciales:

Carcinoma Anaplásico de Tiroides:

- \* MB-1: DSMZ - Colección alemana de microorganismos y cultivos de células.
- \* 8305C: ECACC - Colección europea de cultivos celulares.
- \* BHT-101: DSMZ - Colección alemana de microorganismos y cultivos de células.
- \* CAL-62: DSMZ - Colección alemana de microorganismos y cultivos de células.

Carcinoma Pobremente diferenciado:

- \* BCPAP: DSMZ - Colección alemana de microorganismos y cultivos de células.

Carcinoma folicular:

- \* FTC-238: ECACC (European Collection of Cell Cultures)

Para el mantenimiento de las líneas celulares, se tripsinizan, una vez por semana, dos placas de 90mm de diámetro (CLS430167, Corning® Costar®) para evitar selección de las células. Se lavan las células con PBS y se añade 1mL de tripsina-EDTA 1X (59418C, Sigma-Aldrich).

Se dejan en el incubador a 37°C para que se despeguen y en seguida se neutralizan con 9mL medido h7H. Se pasan a 2 placas de 90mm en una proporción 1:10. Las células se guardan en un incubador (New brunswick Galaxy 170s) en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Este medio se ha de renovar una vez a la semana. Para evitar contaminaciones se trabaja bajo una campana de flujo laminar con una línea de cada vez y entre cada una de ellas se aspira el matraz con agua y lejía al 1%.

### **III.3.3 Sembrado de células para los diferentes experimentos**

Las líneas celulares y los cultivos primarios se siembran un día antes de los experimentos mientras que los demás cultivos primarios se siembran 48h antes.

La relación de número de células con el tipo de placa de cultivo se puede ver en la Tabla III. 2.

**Tabla III.2. Relación del número de células sembradas en distintas placas de cultivo.**

Número de células	Tipo de placa de cultivo	Volumen mínimo de medio de cultivo	Referencias
5.000	Multipocillo-96 MW96	0,1mL	CLS3595, Corning® Costar®
20.000	Multipocillo-24 MW24	1mL	CLS3526, Corning® Costar®
80.000	Multipocillo-6 MW6	3mL	CLS3516, Corning® Costar®
160.000	Placa 90mm p90	10mL	CLS430167, Corning® Costar®

### **III. 4 Estudios funcionales en células**

#### **III. 4.1 Estudio de proliferación celular**

Los ensayos de proliferación se realizaron mediante un método colorimétrico (MTT). Esta técnica consiste en añadir al medio de cultivo una sustancia, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-y) 2,5-dimetiltetrazolio (MTT, M2128, Sigma-Aldrich), (amarillo) que va ser metabolizado por las células que estén proliferando activamente, dando lugar a unos cristales de formazano (púrpura). La variación de color en el medio, amarillo-marrón en las células no proliferantes, a púrpura en células proliferantes, puede verse al cabo de una hora a simple vista.

El MTT se disuelve en PBS a una concentración de 5mg/mL y se guarda a -20°C. La concentración de uso será 0,5mg/mL en medio de cultivo.

Transcurridas 3 horas, se retira el medio y se le añaden 100µL de DMSO que disolverá los cristales formados y se mide a una longitud de onda de 590nm en un espectrofotómetro (LB940, Berthold, Bad Wildbad, Germany).

#### **III. 4.2 Estudio de muerte celular**

El tipo de muerte celular en los experimentos funcionales se ha determinado mediante conteo de apoptosis y por varios tipos de inhibidores.



### III. 4.2.1 Contaje de Apoptosis

En células no apoptóticas los núcleos son esféricos y el DNA está bien distribuido. Durante la apoptosis el DNA se condensa cada vez más, hasta que la célula burbujea, un proceso que lleva varias horas.

Para el contaje de Apoptosis se usó el reactivo Hoechst (bisbenzamida H33258, B2883, Sigma-Aldrich). El Hoechst es un colorante fluorescente que se une al DNA permitiendo ver los núcleos y excitándolo a una longitud de onda de 346nm tiene una longitud de emisión de 461nm que puede ser visualizado en un microscopio de fluorescencia (Olympus IX51/U-RFL-T/TH4-200 acoplado camera Olympus DP72). Puede ser usado en células vivas o fijadas. En células apoptóticas los núcleos se ven azules claros brillantes y pequeños muy intensos, mientras que en células normales los núcleos se ven teñidos mate y poco intensos (Crowley et al, 2016).

El estudio de apoptosis se realizó en experimentos de células transfectadas en placas de multipocillo de 96 y se cuenta todos los días hasta la finalización del experimento.

- \* A cada pocillo se añade 1 $\mu$ L/mL de Hoechst, diluido previamente 1:10 con medio de cultivo (Stock 50 $\mu$ M, en agua destilada).
- \* Se mantiene durante 30-45 minutos en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
- \* En un microscopio de fluorescencia se cuentan el número de células apoptóticas frente al número de células totales. En cada experimento se cuentan un mínimo de 3 replicados y dentro de cada replicado se cuentan 5 o más campos, cada uno a un aumento 20X y se cuentan un mínimo de 20 células totales.

### III. 4.2.2 Inhibidores de muerte celular

Para determinar el tipo de muerte celular se han usado dos inhibidores de Apoptosis (Garcia-Rendueles et al, 2017) y un inhibidor de Necroptosis (Takahashi et al, 2012) (Tabla III.3).

**Tabla III.3. Inhibidores de muerte celular.**

Tipo de Muerte Celular	Inhibidor	Stock y referencia	Uso
<b>Apoptosis</b>	Ac-DEVD-CHO (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al), caspase 3 inhibitor	Se disuelve en DMSO hasta una concentración stock de 2mM. Se alicuotea y se guarda a - 20°C. (A0835, Sigma-Aldrich).	20μM
<b>Apoptosis</b>	Ac-LEHD-CHO, caspase 9 inhibitor	Se disuelve en DMSO hasta una concentración stock de 2mM. Se alicuotea y se guarda a - 20°C. (SCP0095, Sigma-Aldrich).	20μM
<b>Necroptosis</b>	RIP1 inhibitor II, 7-Cl-O-Nec-1	Se disuelve en DMSO hasta una concentración stock de 0.36M. Se alicuotea y se guarda a - 20°C. (504297, Calbiochem).	1μM, 10μM y 100μM

Se siembran 5.000 células por pocillo en placa multipocillo de 96 (ver Tabla III.2). Al día siguiente, junto con la transfección, se añaden al medio de cultivo los inhibidores. Al resto de pocillos a los que no se han añadido los inhibidores, se añade el mismo volumen de vehículo (DMSO) por pocillo. Los inhibidores son renovados con el medio de cultivo cada 2 días.

### **III. 4.3 Estudio del ciclo celular**

#### **III. 4.3.1 Citometría de flujo**

La citometría de flujo es una herramienta rápida que permite a través de fluorocromos y colorantes específicos de DNA estudiar características bien definidas del ciclo celular.

Se han usado diferentes marcadores de DNA, como el yoduro de propidio (PI), el Hoechst y el DAPI. El DAPI fue el que mejor y más ventajas ha demostrado. Es un marcador fluorescente que marca preferentemente la doble cadena de DNA, no necesita el uso de RNAase como el PI y es menos tóxico que el Hoechst.

El estudio se hizo en células con tratamientos y en células transfectadas y el protocolo fue adaptado del trabajo de Zhao et al, 2007:

- \* Se siembran un mínimo de 240.000 células por condición o muestra
- \* Las células se lavan con PBS y se tripsinizan con tripsina-EDTA 1X (T4174, Sigma-Aldrich).
- \* Se añade medio cultivo h7H para neutralizar la tripsina. Cuando se necesitaba un número mayor de células que el obtenido a partir de un único pocillo se juntan varios pocillos con el mismo tratamiento hasta obtener la cantidad requerida.
- \* Centrifugar en una centrifuga a 300g/1.000rpm durante 5 minutos a 4°C.
- \* Se lava el pellet con PBS frío vorteadando.
- \* Se vuelve a centrifugar a 300g/1.000rpm durante 5 minutos a 4°C.
- \* Se lava el pellet con PBS frío vorteadando.
- \* Se vuelve a centrifugar a 300g/1.000rpm durante 5 minutos a 4°C y descarta el sobrenadante, aspirando los posibles restos de PBS con una pipeta.
- \* Se añade 1mL de EtOH al 80% a -20C en agitación usando un vortex para favorecer el correcto fijado de todas las células.
- \* Se incuba durante 30 minutos en frío.
- \* Vortear de nuevo y centrifugar 300g/1.000rpm durante 5 minutos a 4°C.
- \* Se lava el pellet con PBS frío vorteadando.
- \* Se centrifuga a 300g/1.000rpm durante 5 minutos a 4°C.
- \* Se lavar el pellet con PBS frío vorteadando.
- \* Se centrifuga a 300g/1.000rpm durante 5 minutos a 4°C y descarta el sobrenadante, aspirando los posibles restos de PBS con una pipeta.
- \* Se cuenta el número de células con una cámara Neubauer (BRAND™, 718605).
- \* Se tiñen las células con 1mL de solución de DAPI por cada  $1 \times 10^6$  células (TablaIII.4).

- \* Se reparte 300 $\mu$ L de cada muestra en placa multipocillo de 96 y se analizan en el citómetro BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) usando el láser violeta (405nm).

Los datos obtenidos se han analizado con el software FlowJo v\_10.1 (BD Biosciences).

**Tabla III.4. Reactivos de la solución tinción DAPI.**

Solución DAPI	Reactivos y concentración uso	Stock y referencias
	1 $\mu$ g/mL DAPI	2mg/mL en agua destilada. D9542, Sigma-Aldrich. Guardar en alícuotas a -20°C
	0,1% Triton™ X-100	T8787, Sigma-Aldrich
	PBS	

### III. 4.3.2 Estudio de mitosis

#### III. 4.3.2.1 Sincronización de las células

El estudio de mitosis, *per se*, se realizó en experimentos de células normales sin tratamientos y células transfectadas. Sin embargo, la sincronización de las células es comúnmente utilizada en los estudios de progresión del ciclo celular. Con la sincronización se pueden obtener las distintas fases del ciclo celular (Chen et al, 2018).

Para el estudio de la mitosis se han utilizado varios inhibidores, la Colcemida, el Nocodazol y la Timidina. Como se quería saber que pasaba con las células desde G1/S hasta que entrasen en Mitosis se ha utilizado el inhibidor de Timidina. La Timidina a altas concentraciones es un inhibidor de la síntesis del DNA que para las células en la fase S durante la síntesis de DNA (Bjursell and Reichard, 1973). La Timidina se convierte en dTTP, y el exceso de este deoxiribonucleótido es un inhibidor alostérico de la enzima ribonucleasa reductasa, lo cual deplecciona a la célula de otro deoxiribonucleótido, el dCTP y paraliza la síntesis de DNA (Eriksson et al, 1979; Jordan and Reichard, 1998). Como la fase S es larga, se realiza un doble bloqueo con Timidina, insertando en medio un período sin ella donde la célula acaba su ciclo

celular y se divide una vez, para volver a ser inhibida con el segundo bloqueo con Timidina (Ma and Poon, 2016). De esta forma se consigue una mejor sincronización en fase S temprana en la mayoría de las células (Ma and Poon, 2016). Sin embargo, en nuestras células anaplásicas la sincronización se demostró tras el doble bloqueo en Fase S/G2.

El protocolo utilizado fue adaptado de los trabajos de Bostock et al, 1971 y Rodrigue et al, 2013.

Para el primer bloqueo se añade al medio de cultivo 2mM Timidina (stock 200mM en agua, T1895, Sigma-Aldrich). Después de 19h se retira la Timidina haciendo 3 lavados con PBS 1X. Se añade nuevo medio de cultivo y se dejan las células por 5h (*release*). Después del *release* se vuelve a añadir Timidina para un segundo bloqueo durante 19h. Después de este tiempo se hacen 3 lavados con PBS y se van recogiendo los varios tiempos de *release* realizando un *mitotic shake off* en cada uno de esos tiempos para librarnos de las células que hayan conseguido llegar a mitosis a pesar del doble bloqueo, y así aumentar el porcentaje de células sincronizadas. Los tiempos recogidos fueron: T0 (justo al final del doble bloqueo con Timidina), *release* 2h, 4h, 6h, 8h y 10h. Se confirma la sincronización de las células por citometría de flujo.

### III. 4.3.3 Videomicroscopía (*Time-Lapse*)

Para los experimentos de videomicroscopía o *Time-Lapse* se usan placas multipocillo de 96 (ver Tabla III. 2).

Las fotos de contraste de fases y fluorescencia se hacen con el objetivo 20X en intervalos de 5min en un microscopio Leica (CTR7000 HS, Leica) equipado con una cámara de incubación celular humidificada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El microscopio dispone de una platina automática que permite por cada experimento usar varias condiciones de tratamiento y hacer varios replicados. Se suelen hacer un mínimo de 2 campos por replicado y un mínimo de 6 replicados por condición.

Para el estudio de las mitosis, se utiliza como marcador el reactivo SiR-DNA (Spirochrome). Se añade a cada pocillo 0,1 $\mu$ M del reactivo SiR-DNA (stock 1mM en DMSO, guardar en alícuotas a -20°C, SC007, Spirochrome).

El SiR-DNA es un fluoróforo altamente específico para el DNA que tiñe las células vivas: tiene una excitación de 652nm y su emisión en *far red* (674nm) minimiza la fototoxicidad, al contrario de lo que pasa con el Hoescht u otros fluoróforos que emiten en el rango de los verdes (Lukinavičius et al, 2015). Cuando la célula se divide y la cromatina se condensa, la intensidad de SiR-DNA se dobla, y por tanto es fácil distinguir la fracción mitótica (Lukinavičius et al, 2015).

Las fotos han sido analizadas con el programa LASX de Leica v 3.30, ayudada con supervisión manual para el conteo. Con el programa también se generaron los vídeos.

En algunos experimentos, se ha transfectado el plásmido H2B-GFP, Addgene) (Tabla III.11) para marcar específicamente la cromatina en los núcleos.

### **III. 4.4 Estudios de sobreexpresión de PIAS2**

Se utilizaron dos plásmidos de expresión con el promotor CMV, donde está clonada la secuencia humana para cada una de las isoformas de la proteína PIAS2, alfa a y beta b (Flag-hPIAS2a y Flag-hPIAS2b, Addgene) (Tabla III.11). Cada una de las secuencias tiene el *Tag* de FLAG en posición N-terminal.

También se han obtenidos los plásmidos pEGFP-C1 y pEGFP-C1-hPIAS2b cedidos por el grupo del Prof. Stephen P Jackson (Galanty et al, 2009) con el gen reportero EGFP.

Para los experimentos de sobreexpresión se usan placas multipocillo de 96 (Tabla III.2). Se transfectaron las células con estos plásmidos y se hicieron estudios de proliferación celular, Time-Lapse e Inmunofluorescencia.

### ***III.5 RNA de interferencia***

#### ***III.5.1 Pequeño RNA de interferencia de doble cadena (double-stranded small interfering RNA, dsRNAi)***

En el momento de comenzar esta tesis no existían dsRNAi comerciales específicos para la isoforma b de PIAS2. Nuestro laboratorio ya tenía experiencia previa en el diseño y síntesis de dsRNAi (Cañibano et al, 2007). Basado en ella, se han diseñado y sintetizado dsRNAi para PIAS2b y un control negativo sin secuencia diana humana, ns-dsRNAi.

##### ***III.5.5.1 Análisis *in silico*: diseño de los dsRNAi***

Los dsRNAi consisten en una secuencia guía simple con extremo 5', 19 nucleótidos diana específicos para el dsRNA y un extremo 3' con UU's.

Para el diseño se ha utilizado el programa bioinformático BlockiTTM siRNA Designer, Ambion, Life Technologies y las recomendaciones del manual Silencer® siRNA Construction Kit, Ambion (Silencer® siRNA construction kit manual, Ambion absorbida por Life Technologies Corporation y ahora Thermo Fisher Scientific).

Dentro de las secuencias de la isoforma PIAS2 b potencialmente susceptibles como diana se han seguido las siguientes condiciones para seleccionar las definitivas:

- \* Que la secuencia diana empezase por AA: por tanto, la secuencia siRNA acabase en UU, 3' UU *overhanging end* (TT en el oligonucleótido para su transcripción).
- \* Que tuviesen un contenido de G/C entre >25% a 50%

Para cada secuencia del dsRNAi se obtiene una secuencia de oligonucleótidos *sense* y *antisense* complementarias al dsRNAi.

A cada una de las secuencias diana con 21 nucleótidos se añadieron 8 nucleótidos complementarios al primer que contiene el sitio

consenso de unión de la RNA polimerasa bacteriana T7 a promotores (5'-CCTGTCTC-3'), y esto se hizo tanto en la cadena *antisense* como en la *sense*.

Para el control negativo se usó la misma composición de nucleótidos que el dsRNAi experimental, pero sin homología significativa de la secuencia con el genoma humano. Y también se añadieron los 8 nucleótidos complementarios al consenso de la T7 en promotores.

Para elegir las mejores secuencias y eliminar *off targets*, las secuencias han sido revisadas con el programa BLAST (Sayers et al, 2019; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se usaron los siguientes tres parámetros:

1. *Max Score*: Es la puntuación máxima de alineamiento. Según las instrucciones del Silencer® siRNA Construction Kit se recomienda eliminar cualquier secuencia con más de 16–17 pares de bases contiguas que tengan homología con otras secuencias codificantes que no sea nuestra secuencia diana. Cuando la homología de los pares de base es de 100% y son 21 bases contiguas coincidentes con nuestra secuencia diana el parámetro *Max Score* del BLAST es de 38,2. Se decidió no valorar ninguna secuencia que tuviese menos de 15 bases contiguas, o sea cuyo *Max Score* fuese menor a 31.
2. *E- value*: Es un parámetro que determina la probabilidad en una búsqueda BLAST de que una secuencia de longitud determinada dentro de una base de datos de tamaño conocido conteniendo múltiples secuencias de RNA, obtenga coincidencias atribuibles al azar. Es decir, que cuantas más secuencias comparemos y cuanto más pequeña sea la secuencia blasteada, más fácil es que encontremos coincidencias por azar, y por tanto tendremos que corregir nuestra p al número de búsquedas que hagamos. Para la base de datos de NCBI (Sayers et al, 2019; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por lo general, los e-valores de 0,01 o menos son considerados como significativos. Se decidió no valorar ninguna secuencia que tengan un *e-value* mayor que 1.



3. Ensembl: las secuencias se alinearon contra el Ensembl (Zerbino et al, 2018; <https://www.ensembl.org>). Todas las secuencias que cumplan los requisitos anteriores, pero no tengan resultados en Ensembl también fueron excluidas.

Se han obtenido 5 secuencias de dsRNAi (PIAS2b dsRNAi 1, PIAS2b dsRNAi 2, PIAS2b dsRNAi 3, PIAS2b dsRNAi 4 y PIAS2b dsRNAi 5) y un control ns-dsRNAi (Ver Resultados, Tabla IV.3).

#### III.5.5.2 Transcripción de las secuencias molde los dsRNAi

Para la síntesis de las secuencias de dsRNAi se usó un kit comercial de construcción de dsRNAi Silencer® siRNA Construction Kit (AM1620M) (Ambion, luego absorbida por Invitrogen, y ahora Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los oligonucleótidos *sense* y *antisense* han sido sintetizados por la compañía Eurofins (distribuida por Sigma-Aldrich). Los oligonucleótidos son resuspendidos en agua para llevarlos a una concentración de 200 $\mu$ M. Para comprobar la concentración se miden a una Absorbancia de 260nm a una dilución 1:250 para cada oligonucleótido. Cada 1 unidad de OD260nm es 20 $\mu$ g/mL de oligonucleótido (se utiliza 20 en vez de 33  $\mu$ g/mL ya que los oligos de síntesis química vienen muchas veces con cadenas más cortas de las teóricas; recomendación del kit). Se multiplica la absorbancia OD260 por un factor de 5000 (20 \* 250) y se obtiene la concentración en  $\mu$ g/mL. Para determinar la concentración molar se calcula que 1 nanomol de 29-mer son 9,7 microg/nmol (29 \* 0,333 microg/nucleótido). Dividiendo la concentración en  $\mu$ g/mL entre 9,7 se obtienen nmol/mL, y esto es lo mismo que concentración  $\mu$ M.

Se hacen alícuotas de 20 $\mu$ L a una concentración de 100 $\mu$ M y se guardan a -20°C.

En reacciones separadas, las dos secuencias de oligos son hibridadas con el primer del Promotor T7 (incluido en el kit):

Volumen (μL)	Compuesto
2	<i>T7 promoter primer</i>
6	<i>DNA Hyb Buffer</i>
2	<i>Oligo sense o antisense</i>

Mezclar bien los componentes y calentar a 70°C durante 5min. Tras ese tiempo dejar reposar a temperatura ambiente durante 5min.

Se añade a cada tubo, pipeteando con cuidado, la siguiente mezcla:

Volumen (μL)	Compuesto
2	<i>10X klenow Reaction Buffer</i>
2	<i>10X dNTP mix</i>
4	<i>Nuclease-free Water</i>
2	<i>Exo-Klenow</i>

Se incuban en una estufa a 37°C durante 30 min. Se hacen alícuotas de 2μL y se guarda a -20°C.

En esta reacción los extremos 3' del DNA de los oligos hibridados son extendidos por el fragmento de *Klenow* de la DNA polimerasa para crear las secuencias molde del siRNA de una cadena (bien *sense* o bien *antisense*, según el oligo que hayamos elegido).

### III.5.5.3 Síntesis de los dsRNAi

En este proceso, los moldes del siRNAi, bien el *sense* bien el *antisense*, son transcritos por la RNA T7 polimerasa; una vez transcritos ambos RNAs son hibridados para generar el dsRNAi.

Para cada una de las cadenas molde se prepara:

Volumen (μL)	Compuesto
2	<i>Molde sense o antisense</i>
4	<i>Nuclease free water</i>
10	<i>2x NTP mix</i>
2	<i>10x T7 Reaction Buffer</i>
2	<i>T7 Enzyme mix</i>

Se agita suavemente y se incuba a 37°C en una estufa durante 2h.

Tras 2 horas de incubación se mezclan las reacciones *sense* y *antisense* y se vuelve a agitar suavemente. Se vuelve a incubar a 37°C durante toda la noche.

#### III.5.5.4 Preparación y purificación de los dsRNAi

A cada uno de los tubos se añade la solución:

Volumen (μL)	Compuesto
6	<i>Digestion Buffer</i>
48,5	<i>Nuclease-free water</i>
3	<i>RNase</i>
2,5	<i>DNase</i>

Agitar suavemente e incubar a 37°C durante 2h.

Durante esta reacción la mezcla de reacción se digiere con deoxiribunucleasa, que elimina los oligonucleótidos DNA de doble cadena molde, y con ribonucleasa que digiere las cadenas de RNA sencillas que no hayan hibridado con su complementaria. Los dinucleótidos UU *overhanging* permanecen en el siRNA ya que la ribonucleasa no consigue cortar los residuos U.

Tras este tiempo se añade *siRNA Binding Buffer* y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se purifica el dsRNAi para eliminar el exceso de nucleótidos, pequeños, oligómeros, proteínas y sales de la reacción. Para cada preparación de dsRNAi se usa un *Filter Cartridge* en un tubo de 2mL. El filtro es humedecido con 100μL de *siRNA Wash Buffer* y se añade la mezcla de siRNA y *siRNA Binding Buffer* y se centrifuga a 10.000 rpm durante 1min.

Se descarta el líquido decantado y se añade 500μL de *siRNA Wash Buffer* y se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 min. Se repite una vez más este paso y se pasa el filtro a un nuevo tubo donde se añade 100μL de *Nuclease Free water* previamente calentada a 75°C e se

incuba a temperatura ambiente durante 2min. Se centrifuga a 12.000rpm (centrifuga 5415R, eppendorf) durante 2min y el dsRNAi purificado se obtiene en el decantado. Una vez obtenido el dsRNAi se determina su concentración, y se guarda a -20°C.

Para cuantificar el dsRNAi se hace una dilución 1:25 del dsRNAi en TE (10mM Tris-HCl pH 8,1 mM EDTA) y se mide la absorbancia a 260nm. 1 OD 260 nm de dsRNA son 40 microg/ml. Se multiplica la absorbancia obtenida por un factor de 1.000 ( $40 * 25$ ) y se obtiene la concentración en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 1 nmol de dsRNA-21 mer tiene 14 microg de RNA ( $1 \text{ nanomol dsRNA}=21\text{mer} * 2 \text{ cadenas} * 0,333 \text{ microg/nucleótido}$ ). Por tanto, dividiendo los  $\mu\text{g}/\text{mL}$  entre 14 obtenemos los nmol/mL que es lo mismo que la concentración  $\mu\text{M}$ .

Los dsRNAi fueron transfectados en las células con diversos protocolos (ver apartado III.6).

### III.5.2 Antisense LNA GapmeRs

Los *antisense* LNA GapmeRs son herramientas poderosas para estudios de pérdida de función de proteínas, mRNA y lncRNA (RNA largo no codificante). Se trata de un oligonucleótido modificado con una secuencia tal que pueda hibridar con el mRNA diana y, además, realizar su procesamiento por medio de la RNasaH. Los *antisense* LNA GapmeR tienen una longitud de 16 nucleótidos y están enriquecidos con LNA en las regiones de los extremos, flanqueando a una secuencia de DNA central. Las regiones flanqueantes que contienen LNA aumentan la afinidad de unión con el RNA diana, mientras que también confieren resistencia contra las nucleasas. Cuando el GapmeR se hibrida con su RNA diana, la zona central de DNA forma un heterodímero híbrido DNA/RNA. Esto activa muy potentemente la escisión de la cadena de RNA opuesta por la RNasa H. Los LNA GapmeRs están modificados con fosforotioato (PS), lo que asegura la resistencia a la degradación enzimática (Stein et al, 2010).

Nuestro objetivo era saber si los LNA GapmeR tenían la misma eficiencia que nuestros dsRNAi y que posteriormente pudieran ser usados directamente *in vivo*.

Los LNA GapmeR se compraron a la casa comercial Exiqon (distribuida por QIAGEN). En total se testaron cuatro secuencias (dos contra PIAS2b y dos controles) *Antisense* LNA GapmeR, *in vivo* Ready, que tiene un diseño similar al que se utilizará *in vivo*, pero son producidos en pequeña cantidad para ser estudiados primero *in vitro*.

Dos de las secuencias fueron para PIAS2b: la secuencia PIAS2b as-LNA-GapmeR 1 se une alrededor de la región donde se une nuestra secuencia PIAS2b dsRNAi 1 y la PIAS2b as-LNA-GapmeR 2 se une a otra región más 5' de PIAS2b. Junto con estas secuencias se compararon secuencias Control as-LNA-GapmeR (Tabla III. 5).

Tabla III.5. Secuencias de as-LNA-GapmeR.

as-LNA-GapmeR	Product group and name	Secuence (5'-3')	Reference
PIAS2b as-LNA-GapmeR 1	Antisense LNA™ GapmeR, in vivo ready (5) CGGAGGCGGAGCTCCCGCGCC GTTACGTCG	A*G*A*A*A*A*T*C*T*T*G*C*A*T	339523 LG0020488 7-FDA, QIAGEN
PIAS2b as-LNA-GapmeR 2	Antisense LNA™ GapmeR, in vivo ready (5) CGGAGGCGGAGCTCCCGCGCC GTTACGTCG	A*T*T*A*A*A*G*G*C*T*G*A*C*G*G*A	339523- LG0020489 9-FDA
Control as-LNA-GapmeR	Antisense LNA™ GapmeR Control (5) Negative Control A	A*A*C*A*C*G*T*C*T*A*T*A*C*G*C	339515 LG0000000 2-FDA, QIAGEN
Control as-LNA-GapmeR 56 FAM	Antisense LNA™ GapmeR Control (5) Negative Control A	/56- FAM/A*A*C*A*C*G*T*C*T*A*T*A*C*G *C	339515 LG0000000 2-FDA, QIAGEN

El protocolo utilizado fue adaptado de los artículos de Soifer et al, 2012 y Fazil et al, 2016:

- \* Para los experimentos con los *Antisense* LNA GapmeRs, los oligos fueron resuspendidos en una solución de TE-buffer (10mM Tris, pH 8,0, 0,1mM EDTA) (11568846, Invitrogen) a una concentración de stock 50z M.
- \* Se tripsinizaron las células, se neutralizaron con medido cultivo h7H y se contaron. El número de células necesarias para el

experimento se centrifugó a 300g/1000rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en la mitad de volumen de medio necesario para el experimento.

- \* Se prepararon las diferentes concentraciones de as-LNA-GapmeR al doble de lo pretendido en la mitad del volumen total de medio necesario.
- \* Se reparte el volumen de células necesarias por cada tubo donde están preparadas las concentraciones de los as-LNA-GapmeR.
- \* De esta mezcla se reparten 100uL en placas de multipocillos de 96. Por cada condición se hacen 5 replicados y se analiza la proliferación celular por MTT a los 3 y 6 días. En el caso del Control as-LNA-GapmeR marcado con 56 FAM se cuenta la eficacia de transfección a los 2 días mediante fluorescencia.

### **III.6 Transfecciones transitorias dsRNAi y plásmidos**

#### **III.6.1 Purificación de los plásmidos**

Antes de la purificación de los plásmidos se hace la transformación por choque térmico y el crecimiento de los cultivos bacterianos.

Por motivos de reproducibilidad, para la transformación se utilizan bacterias de origen comercial de la especie *Escherichia coli* (Subcloning Efficiency DH5α Competent Cells, Invitrogen, 18265-017). Además de las bacterias, será necesario el uso de placas de Petri LB (Luria Bertani) o 2X LB Broth Lennox (*low salt*)-agar o con la concentración del antibiótico necesario y medio de cultivo líquido LB o 2X LB Broth Lennox (*low salt*) (Tabla III. 6).

- \* Se descongelan las bacterias (almacenadas a -80°C) en hielo.
- \* Se añaden 1-5zL (1-10ng) de DNA a las células que se encuentran en un tubo eppendorf de 1,5mL, mezclando sin pipetear.
- \* Incubar los tubos en hielo durante 30 minutos.
- \* “*Heat shock*” de 20 segundos a 42°C sin agitación.
- \* Colocar los tubos en hielo durante 2 minutos.

- \* Añadir a cada uno de los tubos 950 $\mu$ L de medio LB a 37°C.
- \* Incubar los tubos a 37°C durante 1 hora en agitación (225rpm).
- \* Sembrar en las placas precalentadas a 37°C 200 $\mu$ L de cada producto de la transformación, extendiéndolo con un asa de siembra.
- \* Incubar placas durante toda la noche a 37°C.
- \* Tras incubar las placas durante toda la noche a 37°C deben elegirse 2 o 3 colonias de cada placa de cultivo y extraerse con la ayuda de una punta de micropipeta para cada una.
- \* La punta, con la colonia picada, se introduce en un tubo al que previamente se le ha añadido 6mL de medio LB y antibiótico. Tras 8 horas de crecimiento a 37°C en agitación (225rpm), se transfiere los 6mL de cultivo con las bacterias transformadas a un matraz de Erlenmeyer al que previamente han sido añadidos 250mL de medio LB y antibiótico que se incuba durante toda la noche a 37°C en agitación (225rpm).



**Tabla III.6. Preparación de medios LB y placas de LB-agar.**

Reactivos		Referencias	Preparación
Medio LB (Luria Bertani)	10g/L Triptona	1612, Pronadisa	Se mezclan los reactivos y se autoclavan
	5g/L Extracto de levadura	1702, Pronadisa	
	10g/L NaCl	S9888, Sigma-Aldrich	
	Agua destilada		
Medio 2X LB Broth Lennox (low salt)	20g/L Triptona	1612, Pronadisa	
	10g/L Extracto de levadura	1702, Pronadisa	
	5g/L NaCl	S9888, Sigma-Aldrich	
	Agua destilada		
Placas de LB- agar o 2X LB- agar con Ampicilina, Kanamicina o Carbenicilina	Medio LB o Medio 2x LB Broth Lennox (low salt)		Se mezclan el medio LB o y el agar y se autoclavan. Una vez que esta templado se añade la ampicilina y se vierte en placas. Una vez que han gelificado, se guardan a 4°C.
	15g/L Agar	05039, Sigma-Aldrich	
	100µg/mL Ampicilina	A9518, Sigma-Aldrich Stock 100mg/mL en agua. Se filtra (0,22µm), se hacen alícuotas y se guarda a - 20°C	
	50 µg/mL Kanamicina	K1377, Sigma-Aldrich Stock 10mg/mL en agua. Se filtra (0,22µm), se hacen alícuotas y se guarda a - 20°C	
	100µg/mL Carbenicilina	C9231, Sigma-Aldrich Stock 50mg/mL en agua. Se filtra (0,22µm), se hacen alícuotas y se guarda a - 20°C	

Para la purificación de los plásmidos se usa el kit comercial EndoFree Plasmid Maxi Kit (10) (50912362, QIAGEN). Este tipo de purificación permite obtener plásmidos de una buena calidad y libres de endotoxinas muy importante en los experimentos donde se hace transfección en cultivo primario.



### III.6.2 Métodos de transfección en cultivos primarios y líneas celulares

#### III.6.2.1 Nucleofección Amaxa

Nuestro grupo había estandarizado hace años la nucleofección en células de tiroides con el kit VPI 1005 de Lonza y el Nucleofector™ Iib de Amaxa® (AAB-1001, LONZA) con el programa T-20 (Bravo et al, 2010). Cuando empezamos a realizar los ensayos con las distintas líneas celulares cancerosas vimos que la eficiencia de transfección empleando el programa T-20 era muy baja, por lo que fue necesaria para cada caso una nueva estandarización cambiando tanto los parámetros, programa y kit de transfección. Nuestros resultados transfectando con el plásmido control pmaxGFP (2 $\mu$ g/cubeta) (Tabla III.11) y contando la fluorescencia (Eficiencia) + viabilidad con Trypan Blue (T8154, Sigma-Aldrich) mostraban que los mejores resultados se obtenían con las siguientes condiciones (Tabla III.7):

Tabla III.7. Transfección con Amaxa de las líneas celulares.

Línea celular	Solución	Programa	Viabilidad (%)	Eficiencia (%)
BCPAP	KIT L (VCA-1005, Lonza)	A-20	100	80
FTC-238	KIT L (VCA-1005, Lonza)	A-20	91	91
MB-1	KIT primary mammalian epithelial cell (VPI-1005, Lonza)	T-20	50	90
8305C	KIT L (VCA-1005, Lonza)	A-20	100	78
BHT-101	KIT L (VCA-1005, Lonza)	A-20	75	81
CAL-62	PBS	A-20	85	97

Las células tienen que sembrarse 2 días antes de realizarse la transfección para asegurarse que estén en fase de crecimiento.

En el día de la transfección:

- \* Las células se tripsinizan durante media hora en el incubador y se neutraliza la tripsina con medio de cultivo h7H. Si no se neutraliza bien la tripsina baja la eficiencia de transfección.

- \* Contar el número de células en la cámara de Neubauer. Se necesitan  $1 \times 10^6$  células por cubeta de transfección, con lo que se separan en tubos universales de 25mL y se centrifuga durante 5 minutos a 300g/1.000rpm.
- \* Decantar el medio sobrenadante
- \* Se añaden 100 $\mu$ L de la solución *Nucleofector solution* a la que previamente se le ha añadido el suplemento que vienen en el Kit. Se resuspenden bien las células y se pasan a un tubo cónico donde está la mezcla de DNA previamente preparada (no más de 5 $\mu$ g de DNA totales. Para dsRNAi 40-160 picomoles/cubeta, approx 0,5-2,2 $\mu$ g por  $10^6$  células).
- \* Mezclar bien y pasarlo a la cubeta.
- \* Se coloca la cubeta en el nucleofector, indicando el protocolo a utilizar (tras unos segundos el propio aparato te indica si la transfección se ha realizado correctamente)
- \* Luego se añade 600 $\mu$ L de medio completo en la cubeta. Se saca el medio con una pipeta *Pasteur* y se pone en un tubo universal de 25mL.
- \* Se cuenta el número de células por condición de experimento y se ajusta la concentración de células para que sea igual entre todas ellas.
- \* A partir de aquí, las células se siembran en placas de cultivo con medio h7H previamente calentado a 37°C.

### III.6.2.2 Transfección lipídica

El sistema Amaxa funciona bien pero como necesitábamos también hacer experimentos en cultivos primarios donde las células son más escasas, y no es posible disponer de un millón de células por cubeta/ condición. Se estandarizaron métodos alternativos de transfección para los cultivos primarios, e iguales para las líneas celulares con el método basado en polímeros catiónicos. Estos forman complejos con el DNA/dsRNAi, cargados negativamente, que ayudan a introducir este material al interior de las células y lo protegen de degradaciones.

Para la estandarización se compararon varios reactivos poliméricos (K2, T060-0.75, Biontex; Eugene6, E2311, Promega; Eugene HD, E2691, Promega; Turbofect, R0531, Thermo Fisher y Viafect, E498, Promega).

Para optimizar la transfección y reducir la citotoxicidad, se utilizaron dos cantidades de plásmido pmaxGFP (Tabla III.11) (0,1 a 0,2 $\mu$ g / pocillo) combinando con diferentes cantidades de lípidos. La cantidad de cada reactivo se ha de ajustar para cada tipo de células (Tabla III. 8).

En los experimentos de sobreexpresión de la proteína PIAS2b y PIAS2a la cantidad de plásmido se debió reducir a 0,05 $\mu$ g, debido a la toxicidad de su sobreexpresión.

**Tabla III.8. Transfección con Lípidos de las líneas celulares y cultivos primarios.**

Línea celular	Solución	Eficiencia (%)
BCPAP	TURBOFECT	84
FTC-238	TURBOFECT	81
8305C	TURBOFECT	81
CAL-62	VIAFECT	85
BHT-101	TURBOFECT	60
MB1	VIAFECT	55

Cultivo primario	Solución	Eficiencia (%)
T-NT2	TURBOFECT	67
T-NT36	TURBOFECT	55
T-NT39	TURBOFECT	74
T-NT47	TURBOFECT	85
T-NT52	TURBOFECT	73
T-NT66	TURBOFECT	67
T-GD9	TURBOFECT	43
T-MNG94	VIAFECT	68
T-MNG95	TURBOFECT	81
T-MNG96	TURBOFECT	77
T-MNG100	TURBOFECT	78
T-MNG170	TURBOFECT	76
T-MNG180	TURBOFECT	82
T-MNG182	TURBOFECT	84
T-PC35	TURBOFECT	70
T-PC46	TURBOFECT	76
T-PC48	TURBOFECT	80
T-PC64	TURBOFECT	69
T-PC65	TURBOFECT	74
T-M19	TURBOFECT	78
T-FC7	TURBOFECT	77
T-UC1	VIAFECT	70
T-UC2	VIAFECT	65
T-UC3	VIAFECT	73

- \* Se siembran un número determinado de células de acuerdo al tipo de placa utilizado (Tabla III.2). Tras 24h para las líneas celulares y o 48h para los cultivos primarios: T-NT2, T-UC1, T-UC2 y T-UC3), estarán entre un 70-90% de confluencia.
- \* Una vez estandarizadas las cantidades de lípidos, plásmido y dsRNAi se utilizan las cantidades para cada pocillo de la multiplaca descritas en la Tabla III.9, Tabla III.10 y Tabla III.11.

**Tabla III.9. Relación de cantidades utilizadas para la transfección con Turbofect.**

Placa de cultivo	Número de células sembradas	Volumen de medio por pocillo al inicio de la transfección (mL)	Cantidad de DNA o dsRNAi (µg)	Volumen de Turbofect por pocillo (µL)	Volumen final de la mezcla por pocillo (µL)	Volumen final de medio por pocillo (mL)	Rango concentración dsRNAi desde el inicio hasta el final transfección (nM)
Multipocillo 96	5.000	0,1	0,2	0,5	25	0,1	140
Multipocillo-24	20.000	0,25	1	2	100	1	285-71
Multipocillo-6	80.000	1	2	6	400	3	142-47

**Tabla III.10. Relación de cantidades utilizadas para la transfección con Viafect.**

Placa de cultivo	Número de células sembradas	Volumen de medio por pocillo al inicio de la transfección (mL)	Cantidad de DNA o dsRNAi (µg)	Volumen de Viafect por pocillo (µL)	Volumen final de la mezcla por pocillo (µL)	Volumen final de medio por pocillo (mL)	Rango concentración dsRNAi desde el inicio hasta el final transfección (nM)
Multipocillo 96	5.000	0,1	0,2	0,6	10	0,1	140
Multipocillo-24	20.000	0,25	1	3	100	1	285-71
Multipocillo-6	80.000	1	2	12	400	3	142-47

- \* Se añade una cantidad de DNA/dsRNAi adecuada a un volumen de medio sin suero ni antibióticos, normalmente medio h7H sin aditivos.
- \* Vortear el reactivo de Turbofect/Viafect y añadir la cantidad necesaria al DNA/dsRNAi diluido. Mezclar rápidamente la mezcla con un vórtex.
- \* Incubar a temperatura ambiente durante 25-30 minutos.
- \* Durante este tiempo, en el caso de los cultivos que se siembran 48h antes, cambiar el medio de los pocillos que se vayan a utilizar con el volumen adecuado de medio completo h7H.
- \* Añadir gota a gota sobre cada pocillo la mezcla de DNA/dsRNAi y Turbofect/Viafect. Rápidamente, agitar la placa para ayudar a que se distribuyan los complejos por todo el pocillo.

- \* Mantener en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
- \* Tras 8 horas se añade el resto del medio al pocillo.

**Tabla III.11. Plásmidos utilizados en este trabajo.**

PLASMIDO	ORIGEN	REFERENCIA
MI-Luciferase-IRES-mCherry	Xiaoping Sun (Addgene plasmid # 75020)	Mallampati, et al, 2014
pEGFP-C1	Gift from Stephen P Jackson, Cancer Research UK Laboratories at the Wellcome Trust/Cancer Research UK Gurdon Institute	Galanty et al, 2009
pEGFP-C1-hPias2b	Gift from Stephen P Jackson, Cancer Research UK Laboratories at the Wellcome Trust/Cancer Research UK Gurdon Institute	Galanty et al, 2009
Flag-hPIASx beta	Ke Shuai (Addgene plasmid # 15210)	Arora et al, 2003
Flag-hPIASx alpha	Ke Shuai (Addgene plasmid # 15209)	Arora et al, 2003
pFLAG-CMV <sup>TM</sup> -1 Expression Vector	E7273, Sigma-Aldrich	
pmaxGFP	Comercial, incluido en los Kit Amara, Lonza	
H2B-GFP	Geoff Wahl (Addgene plasmid # 11680)	Kanda et al, 1998
TRIPZ Inducible Lentiviral Non-silencing shRNA Control	Catalog #RHS4743, Dharmacon	
TRIPZ Human PIAS2 shRNA	RHS4696-200680115 Dharmacon	
psPAX2	Didier Trono (Addgene plasmid # 12260) Plásmido de empaquetamiento de 2ª generación	
pHelper virus	From our lab	Cañibano et al, 2007
pCMV-VSV-G	Bob Weinberg (Addgene plasmid # 8454)	Stewart et al, 2003

### ***III.7 Generación de poblaciones estables mediante transducción viral***

Con las transfecciones transitorias no es posible hacer experimentos a largo plazo una vez que el pico de expresión del gen es entre 24h a 96h. Para conseguir líneas que tengan la expresión del gen deseada a largo plazo la generación de líneas estables es una buena opción.

Para este estudio se han utilizado dos sistemas de líneas estables con lentivirus y con retrovirus.

### III.7.1 Lentivirus y retrovirus

Los retrovirus y los lentivirus son virus con *positive-strand RNA* que integran su genoma en las células hospedadoras de forma estable permitiendo la expresión del transgen o shRNA a largo plazo.

En los lentivirus la transducción se hace en células proliferantes y no proliferantes mientras que los retrovirus solo infectan y se expresan eficientemente en células proliferantes.

En esta tesis se utilizaron poblaciones estables en dos diseños experimentales:

A) PIAS2 shRNA: Como el objetivo era hacer estudios de inhibición de la proliferación celular es necesario que las secuencias de shRNA estén en un vector con expresión regulada. Esto es porque si al bajar la expresión de la proteína PIAS2 esta inhibe el crecimiento celular, si infectamos con un lentivirus que exprese el shRNA para la proteína PIAS2, al generar una línea estable se estarán seleccionando las células que menos expresan. Se decidió buscar una secuencia de shRNA para la proteína total PIAS2 clonada en un vector inducible, con un sistema *Tet-on* el vector TRIPZ Inducible Lentiviral shRNA de Thermo Scientific. Este, en presencia de la Doxiciclina induce la expresión de shRNA y al mismo tiempo se expresa una proteína roja (TurboRFP). Con este sistema se puede garantizar la obtención de poblaciones estables donde esta inhibida la expresión de la proteína y se pueden hacer un seguimiento celular.

B) *Patient-derived Xenografts* (PDX) *in vivo*: Para el seguimiento de los PDX *in vivo* se generó una población de T-UC1 que pudiese ser evaluada por luminometría con el retrovirus MI-Luciferase-IRES-mCherry.

### III.7.2 Producción de lentivirus/retrovirus

Para producir partículas lentivirales/retrovirales se necesitan 3 componentes principales:

- \* **Transfer vector:** Los plásmidos lentivirales o  $\gamma$ -retrovirales que codifican nuestro gen. La secuencia del gen está flanqueada por secuencias terminales repetidas largas (LTR) que facilita la integración de la secuencia en el genoma de la célula;
- \* **Packaging vector:** Un plásmido que contenga genes de empaquetamiento virales (Gag-Pol). Gag es una proteína precursora estructural y Pol una polimerasa;
- \* **Envelope vector:** Un plásmido que contenga genes de la envuelta (VSV-G). VSV-G codifica para glucoproteínas de la envuelta viral que son esenciales para la entrada de los virus en las células. Se utiliza el plásmido pVSV-G.

Los lentivirus y los  $\gamma$ -retrovirus usan los mismos productos genéticos para el empaquetamiento (es decir, Gag, Pol y Env) pero las isoformas de estas proteínas, así como las LTR virales, difieren. Como resultado, los plásmidos de empaquetamiento lentiviral y  $\gamma$ -retroviral no son intercambiables pero los plásmidos de envoltura general, como el VSV-G, sin embargo, pueden usarse en ambos sistemas (Tabla III.12).

Tabla III.12. Componentes de los lentivirus y retrovirus.

Componentes	Lentivirus	Retrovirus
<b>Transfer vector</b>	TRIPZ Inducible Lentiviral Non-silencing shRNA Control y TRIPZ Human PIAS2 shRNA (de segunda generación, el LTR es dependiente de Tat.	MI-Luciferase-IRES-mCherry
<b>Packaging vector</b>	psPAX2	pHelper virus
<b>Envelope vector</b>	pCMV-VSV-G	pCMV-VSV-G

Para la obtención de estos lentivirus/retrovirus a partir de células HEK293FT, se han probado varios métodos de transfección. Se han usado lípidos, el Turbofect de Thermo Fisher y el FuGENE 6 y FuGENE HD de Promega y el método de  $\text{CaCl}_2$ .



El método donde hubo un porcentaje transfección y un título más elevado fue el con CaCl<sub>2</sub> (protocolo adaptado de Trono labs):

- \* Se siembran 2x10<sup>6</sup> células HEK293FT en placas de 90mm con medio completo. Normalmente, se suelen sembrar 12 placas de 90mm.
- \* Al día siguiente, se lavan las células con PBS y se añaden 10mL de medio completo (Tabla III.13) sin antibióticos (penicilina-estreptomicina). Se mantienen en el incubador durante 1 hora.
- \* Por cada placa, en un tubo eppendorf se prepara la siguiente mezcla:
  - 20 $\mu$ g *Transfer vector*
  - 15 $\mu$ g de pHelper virus
  - 6 $\mu$ g de pVSVG (retrovirus) o psPAX2 (lentivirus)
- \* Se ajusta el volumen hasta 437,5 $\mu$ L con agua miliQ y se mezcla bien con la pipeta.
- \* Vortear mientras se añaden 500 $\mu$ L de 2X de solución salina de Hanks (HBSS) y 50 $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> (Tabla III.14).

**Tabla III.13. Preparación del medio de cultivo completo para la línea HEK293FT.**

Medio de cultivo completo	Preparación y referencias
Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)	D5796, Sigma-Aldrich
10% de Suero fetal bovino (FBS)	Se ha de centrifugar 5 minutos a 1.000rpm. 10270-106, Gibco®
1X Penicilina-Estreptomicina	Stock 100X; P0781, Sigma-Aldrich
5X L-glutamina	Stock 200mM (100X); 25030-024, Gibco®
5X MEM aminoácidos no esenciales (MEM NEAA)	Stock 100X; 11140-050, Gibco®
5X Piruvato de sodio	Se disuelve en PBS a una concentración de 22g/L (200mM; 200X) y se filtra (0,22 $\mu$ m). Las alícuotas se guardan a -20°C. P5280, Sigma-Aldrich

**Tabla III.14. Preparación de los reactivos 2xHBSS y CaCl<sub>2</sub>.**

Stock y preparación	
<b>2X HBSS</b>	En agua miliQ se disuelven 280mM NaCl, 50mM HEPES, 1,42 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (pH 7,05). Ajustar el pH a 7,0 con 10M de NaOH. Se esteriliza utilizando un filtro de 0,22μm, y se guarda a -20°C
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Se prepara en agua miliQ a una concentración stock de 25M. Se esteriliza por un filtro de 0,22μm, se alicuotea y se guarda a -20°C.

- \* Incubar a temperatura ambiente durante 20-25minutos.
- \* Gota a gota añadir 1mL de la mezcla a cada placa de 90mm. Agitar la placa con cuidado para ayudar a que se distribuya por toda la placa.
- \* Mantener en un incubador durante 12-15h a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>.
- \* A continuación, retirar el medio de las placas y añadir 6mL de medio completo con antibióticos.
- \* Al día siguiente, recoger el medio de las placas y añadir 10mL de medio de cultivo completo. El medio recogido se centrifuga 5 minutos a 1.000rpm para eliminar restos celulares y virus agregados.
- \* El sobrenadante se pasa por un filtro de jeringa de 0,45μm de acetato de celulosa o PES (Fisher brand 1521-6869, Thermo Fisher Scientific) y se guarda a 4°C en tubos falcon cónicos.
- \* Tras 24 horas, se recoge nuevamente el medio de las placas, se centrifuga 5 minutos a 1.000rpm y se pasa por un filtro PES de 0,45μm. Se mezcla con el otro medio guardado a 4°C y se mantiene en hielo húmedo. Comprobar que al menos un 90% de las células HEK293FT que quedan en el plato expresan TurboRFP o mCherry para continuar con el siguiente proceso.

### III.7.3 Concentración de las partículas retrovirales

Para realizar los experimentos *in vitro* e *in vivo* se necesita un título viral alto. Por lo que se procede a concentrar por centrifugación las partículas virales obtenidas en el proceso anterior.

- \* Repartir el medio con partículas virales en 6 tubos *UltraClear* (344058, Beckman Coulter) que están en hielo húmedo y depositarlos en los contenedores *buckets* específicos del rotor basculante SW32Ti (369694, Beckman Coulter).
- \* Se pesan los 6 *buckets* con su tapa correspondiente y se iguala el peso entre sí con medio hasta un volumen máximo de 38,5mL.
- \* Se colocan en el rotor y se centrifugan a 19.500rpm durante 2 horas a 4°C en una ultracentrífuga Optima L-100XP (392052, Beckman Coulter).
- \* Se abren los *buckets*, se sacan los tubos y se decanta el sobrenadante, intentando retirar lo máximo posible de líquido.
- \* El *pellet* se resuspende en 60z L de medio Coom's h7H y se incuba en hielo húmedo durante 10 minutos.
- \* Mezclar bien cada tubo con una pipeta evitando la formación de burbujas y juntar todo el volumen en un tubo eppendorf.
- \* Centrifugar a máxima velocidad durante 4 minutos para eliminar los agregados de proteínas procedentes del suero del medio de cultivo de las células HEK293FT.
- \* El sobrenadante se reparte en alícuotas de 50z L que se guardan a -80°C.

### III.7.4 Titulación viral por qPCR

Este método de titulación viral se basa en la cuantificación de las partículas virales presentes en cada solución de lentivirus TRIPZ (T-Ser-sh y T-PIAS2-sh) a través de la detección por qPCR. Para esta experiencia se utilizó el protocolo adaptado del trabajo de Barczak et al, 2015:

- \* Se empieza por extraer 5uL del DNA presente en las partículas virales utilizando el kit PureLink® Viral RNA/DNA Mini Kit (12280-050, Invitrogen).
- \* Se prepara una curva de calibrado utilizando el plásmido T-Scr-sh de concentración conocida y se realizan diluciones seriadas (1:10) partiendo de una concentración inicial de 10ng/zL que correspondería al estándar 1 hasta el estándar 8.
- \* Se preparan también varias diluciones seriadas de los lentivirus (T-Scr-sh y T-PIAS2-sh).
- \* Como el protocolo se basa en la titulación de la cadena que ya está en forma de cDNA presente en la cápside vírica no hace falta hacer RT.
- \* Se hace una PCR cuantitativa (qPCR) de los estándares y de las muestras de partículas virales (descrita en apartado III.9.2), con master mix para SybrGreen (Brilliant III Ultra-Fast SYBR MasterMix (600882, Agilent Technologies) y los cebadores para WRPE (Tabla III.18).
- \* Se representa la curva de calibrado por una regresión lineal con las medias de los ciclos obtenidos (*Ct means*) ( $Y = Ct\_range$ ) con respecto a la concentración ( $X = LN\_plasmid\_mass\_range$ ) de cada uno de los estándares del plásmido del virus y se calculan los siguientes parámetros:
  - $k = PROJ.LIN(Ct\_range, LN\_plasmid\_mass\_range)$
  - $Y: Intercepción = INDICE(PROJ.LIN(Ct\_range, LN\_plasmid\_mass\_range), 2)$
  - $R^2 = INDICE(PROJ.LIN(Ct\_range, LN\_plasmid\_mass\_range), 3)$
  - Pendiente:  $= k * LN(10)$
  - Eficiencia del primer:  $= Potencia(10, -1/Pendiente)$
- \* Una vez calculados estos parámetros se calcula la cantidad de DNA de cada muestra de acuerdo con la siguiente formula:

Cantidad de DNA =  $EXP((Ct\_range - Y \text{ intercepción})/k) / \text{Dilución}$

- \* Una vez conocida la cantidad de DNA de cada muestra se calcula el número de moléculas por mL de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Nº de moléculas} = \text{Cantidad de DNA} * (6,0221 \times 10^{23} / 1.000) / (\text{N} * 650)$$

donde N corresponde a la longitud del plásmido de DNA de doble cadena (en este caso 13.400 pares de bases) y 650 es la masa promedio de 1 base de DNA de doble cadena.

- \* Si se ha diluido la muestra en el primer pase se hace corrección de la dilución, multiplicando por el factor de dilución. El resultado final se expresa en partículas virales/mL

### **III.7.5 Titulación viral funcional**

La titulación viral permite conocer la concentración de partículas virales en un volumen determinado. Es importante complementar esta la titulación viral absoluta con una titulación funcional que mida las unidades de infección de esa población viral (virus completos que infecten) tanto en las células productoras (HEK293FT) como en una de las líneas donde se pretende hacer los experimentos.

- \* Sembrar 50.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos con medio de cultivo completo. Al día siguiente, las células han de estar entre un 40-50% de confluencia.
- \* En una multiplaca de 96 pocillos con fondo redondo hacer diluciones seriadas (1:5) del virus con medio sin suero ni antibióticos (DMEM para las HEK293FT y h7H sin aditivos para líneas celulares de tiroides):
- \* Para ello se añaden 80µL de medio a 8 pocillos.
- \* Coger 20µL del stock del virus y añadirlos al pocillo A1, tal como se muestra en el siguiente Tabla III.15:

Tabla III.15. Cálculo del título viral.

Multipocillo 96 Origen	Multipocillo 24 Destino	Volumen de virus diluido usado ( $\mu$ L)	Factor de dilución
A1		25	5
A2	A1	25	25
A3	A2	25	125
A4	A3	25	625
A5	A4	25	3.125
A6	A5	25	15.625
A7	A6	25	78.125
A8		25	39.0625

- \* Mezclar bien con una pipeta (al menos 15 veces) y con una nueva punta se transfieren 20 $\mu$ L al pocillo A2.
- \* Repetir el proceso hasta el pocillo A8. Se incubaba a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- \* Durante este tiempo, las células sembradas el día anterior se lavan con PBS dos veces. Se añaden 225 $\mu$ L de medio de cultivo sin suero y con 8,9 $\mu$ g/mL de polibreno (stock 2mg/mL, H9268, Sigma-Aldrich). Se realiza la transducción viral añadiendo 25 $\mu$ L del pocillo A2 de la multiplaca de 96 al pocillo A1 del pocillo de cada réplica de 24 pocillos.
- \* Repetir el proceso del A3 al A7.
- \* Se incuban las multiplacas de 24 pocillos durante 4 horas en un incubador a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>.
- \* Los pocillos se lavan una vez con PBS y se añade 1mL de medio completo con 2  $\mu$ g/mL Doxiciclina (stock 2mg/mL en agua, D9891, Sigma-Aldrich, guardado a en alícuotas -20°C) en el caso de los lentivirus TRIPZ.

Para determinar la concentración de Doxiciclina que mejor induce la expresión de los shRNAs se empezó por hacer transfecciones transitorias usando lípidos (Turbofect, Thermo Fisher) y con electroporación con Amaxa (estandarizada anteriormente para cada línea), con cada uno de los plásmidos en la línea celular CAL-62. Se usaron las concentraciones 0 $\mu$ g/mL (Control), 0,5 $\mu$ g/mL, 1 $\mu$ g/mL y 2 $\mu$ g/mL. La mejor concentración fue la de 2 $\mu$ g/mL.

- \* Mantener durante 72 horas en incubador a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>.
- \* Se cuentan las colonias de células TurboRFP o mCherry positivas en cada pocillo correspondiente a cada factor de dilución. Cada colonia está formada por un grupo pequeño de células y se ha de considerar como si fuera una célula transducida debido a las divisiones celulares producidas durante las 72 horas previas.
- \* Las unidades de transducción por mL (TU/mL) se calculan de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Colonias positivas} \times \text{Factor de dilución} \times 40 = \text{TU/mL}$$

En esta fórmula el número de colonias y factor de dilución son los correspondientes al pocillo de mayor factor de dilución en el cual se visualizaron colonias. El número 40 es para convertir los 25  $\mu$ L usados en la titulación a 1 mL.

### III.7.6 Transducción viral

Después de obtenidos los lentivirus T-Scr-sh y T-PIAS2-sh se ha infectado la línea celular anaplásica de tiroides CAL-62.

- \* Se siembran 200.000 células por pocillo de multiplaca de 6 pocillos en medio de cultivo completo.
- \* Al día siguiente, se lavan las células 2 veces con PBS y se añaden 1.000  $\mu$ L de medio de cultivo sin suero ni antibióticos y con 8,9  $\mu$ g/mL de polibreno (stock 2mg/mL, H9268, Sigma-Aldrich).
- \* Añadir la cantidad apropiada de partículas retrovirales de acuerdo con la multiplicidad de infección (MOI) más adecuada. Por lo que previamente, se realiza una prueba infectando las células con distintos MOI, donde en nuestro caso se obtuvo el número máximo de colonias con 5 MOI. La cantidad de lentivirus se obtiene de las siguientes fórmulas:

$$\text{N}^{\circ} \text{ total de células} \times \text{MOI deseados} = \text{TU (unidades totales de transducción que necesitas)}$$

$$\text{TU (totales que necesitas) / TU/mL (que tiene cada virus)} = \text{mL de virus que se han de añadir por pocillo.}$$

- \* Una vez añadida la cantidad de partículas virales necesarias de acuerdo con la fórmula anterior, se incuban las multiplacas hasta el día siguiente en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
- \* Añadir 1mL de medio de cultivo completo con suero y penicilina a cada uno de los pocillos e incubar durante 48 horas.
- \* Las células positivas se seleccionan con Puomicina (Tabla III.16) y se han generado las líneas estables reguladas CAL-62 T-PIAS2\_shRNA y CAL-62 T-Scr\_shRNA.

Antes de generar las líneas estables, para cada línea celular se hicieron ensayos de toxicidad (*kill curve*) de la Puomicina (P8833, Sigma-Aldrich), que es el antibiótico de selección de las células infectadas.

Para ello se sembró para cada línea 200.000 células en un multiplaca de 6 pocillos, el mismo número de células que se usa para infectar las células con los lentivirus.

Al día siguiente cuando las células están pegadas se añade a cada pocillo una concentración de Puomicina en un rango de 0 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . A cada dos días se añade medio fresco con las diferentes concentraciones de Puomicina durante varios días hasta observar la mínima concentración de Puomicina que mate todas las células (Tabla III.16). Para la línea BHT-101 se tuvo que subir el rango hasta los 16  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla III.16. Concentración Puomicina para seleccionar en cada línea celular.**

Líneas celulares	Concentración de Puomicina ( $\mu\text{g/mL}$ )
BCPAP	0,5
MB-1	0,5
BHT-101	16
8305C	1,1
CAL-62	10



Se observó que algunas de las células de las líneas generadas expresaban la proteína roja sin que fueran inducidas por Doxyciclina. Esto puede ser explicado por *leaking* del sistema o por la Tetraciclina, que es un contaminante del FBS, del medio de cultivo que genera un efecto similar a la Doxyciclina. Para eliminar estos dos posibles problemas se pasó a cultivar estas líneas en medio de cultivo con FBS libre de Tetraciclina (631106, Clontech), y además se diseñó una estrategia de selección negativo/positiva con el sorter.

Primero pues, en ausencia de Doxyciclina, se han seleccionado por el *sorter* las poblaciones negativas (no rojas) de cada línea CAL-62 T-PIAS2<sub>shRNA</sub> y CAL-62 T-Scr<sub>shRNA</sub>. Posteriormente, se han pasado por el *sorter* células de estas mismas poblaciones pero que habían sido inducidas con Doxyciclina durante la noche anterior a sortearlas. Se han seleccionado las poblaciones rojas (HI) y las muy rojas (SU).

Las poblaciones seleccionadas se sembraron en ausencia de Doxyciclina para volviesen a poner no rojas, negativas, y creciesen sin diferencias. Se han generado así cuatro poblaciones reguladas para la línea celular CAL-62:

- T-PIAS2<sub>HI</sub>\_shRNA
- T-PIAS2<sub>SU</sub>\_shRNA
- T-Scr<sub>HI</sub>\_shRNA
- T-Scr<sub>SU</sub>\_shRNA

Para la generación de población en cultivos anaplásicos de tiroides (T-UC1) que expresase Luciferasa/mCherry el protocolo normal de infección viral explicado anteriormente no funcionó. Nuestros cultivos primarios de tiroides humano son intrínsecamente resistentes a la infección por virus, como muchas células primarias (Hines et al, 2016). Se ha propuesto que la presencia de ciertos glucosaminoglucanos/proteoglucanos en la superficie tanto membrana de la célula como cápside del virus es la responsable de la dificultad de infección por lentivirus y adenovirus de células epiteliales humanas (Arcasoy et al, 1997; Hines et al, 2016). Esto dificulta la infección con virus para generar líneas estables. Como el objetivo de generar esta línea era posteriormente ser usado en ratones, se pretendía obtener el

mayor número de células infectadas posible sin recurrir a la selección de células por *sorter* para tener toda la heterogeneidad de las poblaciones celulares presentes en el carcinoma del paciente.

Después de haber probado varios métodos, el que mejor resultado ha dado fue el protocolo adaptado del trabajo de Denning et al, 2013:

- \* Se siembran 40.000 células por pocillo en multiplaca de 24 pocillos con medio de cultivo h7H completo.
- \* Al día siguiente, se lavan las células con PBS y se añaden 250µl de medio de cultivo h7H completo y con de 6 z g/mL de DEAE-Dextran (31390, Sigma-Aldrich).
- \* Añadir la cantidad apropiada de partículas retrovirales de acuerdo con la multiplicidad de infección (MOI). Usar entre 5 MOI – 7 MOI.
- \* Incubar hasta el día siguiente en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
- \* Añadir 250 zL de medio de cultivo h7H cada uno de los pocillos e incubar durante 48horas.
- \* Transcurridas las 48h se lavan los pocillos con PBS y se añade medio h7H fresco.
- \* La eficacia de la transducción viral se comprueba por microscopia de fluorescencia (Olympus IX51/U-RFL-T/TH4-200 acoplado camera Olympus DP72), por ensayos de luciferasa con un luminómetro (Multimode Mithras LB 940, Berthold Technologies) y el aparato IVIS (IVIS Spectrum Perkin Elmer).

### **III.8 Estudios DNA**

#### **III.8.1 Extracción de DNA**

La extracción de DNA se realizó con el kit DNeasy blood & tissue kit 50 (Cat.69504, QIAGEN) para los cultivos, la extracción del DNA de tejidos se realizó con el kit Allprep DNA/RNA Mini kit 50 (Cat. 80204, QIAGEN).

### **III.8.2 Cuantificación de DNA**

La cuantificación del DNA se realiza con el kit Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Cat.4343895, Thermo Fisher Scientific) y se mide con un equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

### **III.8.3 Perfil STRs**

Para realizar el perfil genético de los cultivos primarios y sus tejidos se usa el kit AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit PCR (Applied Biosystems), que indaga 16 STRs del genoma humano cuyas combinaciones dan una identificación/discriminación superior a 10-23.

Tras la PCR, la reacción se sometió a electroforesis capilar en un Abiprism 3100 Genetic Analyzer en paralelo con el marcador Identifiler kit Allelic Ladder. 1µl de la reacción se añadió a 9µl de Hi-Di Formamida y 1µl de GeneScan™ 500 LIZ™, se coció a 95°C por 3min y se enfrió en hielo rápidamente antes de cargar la electroforesis, la cual se realizó en condiciones estándar. Los resultados se analizaron con Gene Mapper.v1.4.

## ***III.9 Estudio de RNA***

### **III.9.1 Extracción de RNA**

Para la extracción de RNA de tejidos se usa el kit Allprep DNA/RNA Mini kit 50 (Cat. 80204, QIAGEN).

Para la extracción de RNA de los cultivos primarios en placa de 96 se usa el reactivo TRIzol™ (15596026, Invitrogen) y se siguen las indicaciones descritas por el proveedor. El RNA obtenido se trata con DNaseI libre de RNAasas (EN0521, Thermo Fisher) y después se purifica mediante el kit GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro kit (K0842, Thermo Fisher).

Para la extracción de RNA de experimentos en placa multipocillo de 24 se usa el reactivo TRIzol™ (Invitrogen, 15596026) y no se purifica ya que la cantidad de células no es suficiente para el rendimiento necesario de la columna.

A continuación, se determina la calidad del RNA y se cuantifica usando un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Fisher) (ratio deseable A260/280=2-2,2).

### **III.9.2 Retrotranscripción de RNA a cDNA**

En primer lugar, hacemos un pretratamiento de la muestra. Para ello incubamos 1µg de RNA total con 1IU de DNaseI libre de RNAasas (EN0521, Thermo Fisher), excepto en el RNA obtenido de extracción de multipocillo que resuspendemos todo el precipitado en 8µL y lo tratamos completo.

Después se realiza la síntesis de DNA complementario (cDNA) a través de una transcripción inversa:

- 1,5µL de dNTPs 10mM
- 0,1µL random primers
- 6µL 5X First-Strand Buffer
- 3µL M DTT
- 1µL RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 units/µL)
- 1,5µL M-MLV 300 UI (28025-013, Invitrogen, USA).

En un termociclador T100 Thermal Cycler Bio-Rad se aplica el protocolo:

- 25°C 10min
- 37°C 50min
- 42°C 30min
- 95°C 5min

### III.9.3 PCR cuantitativa

Para cuantificar la expresión se realiza una PCR cuantitativa (qPCR) usando 1 $\mu$ L de cDNA y las siguientes cantidades de reactivos (Tabla III.17):

Tabla III.17. Reactivos para el Ensayo TaqMan y Sybr.

Vol final 12μL	Ensayo TaqMan		Ensayo Sybr	
<i>Fw-primer</i>	Mix 1μL	0,3μM en 12μL finales	0,18μL (stock 10uM)	0,15μM en 12μL finales
<i>Rv-primer</i>		0,3μM en 12μL finales	0,18μL (stock 10uM)	0,15μM en 12μL finales
<i>Probe (Pb)</i>		0,3μM en 12μL finales		
H <sub>2</sub> O	4μL		4,64μL	
Master Mix 2x (adaptada a cada ensayo)	6μL			
Muestra (cDNA)	1μL			

- \* Ensayo sybr: Brilliant III Ultra-Fast SYBR Master Mix (600882, Agilent Technologies).
- \* Ensayo TaqMan: TaqMan gene expression Master Mix (cat 4369016, Applied Biosystems).

Se añaden los reactivos en una placa multipocillo de 96 y se realiza la qPCR mediante un termociclador 7500 Real-Time PCR System (4351105, Applied Biosystems).

Los cebadores o *primers* utilizados se muestran en la Tabla III.18.

En una placa multipocillo de 96 (FrameStar 96, 4titude), se utiliza cada pocillo para una sola reacción. Cada muestra se mide por duplicado junto con controles positivos (muestra de tejido que expresa, plásmido) y negativos (todos los reactivos a excepción de MMLV en la reacción de retrotranscripción) de la técnica y blancos (en la PCR todos los reactivos a excepción del cDNA). Como gen control de la expresión basal para los ensayos cuantitativos de mRNA se utiliza TBP, ya que su expresión es estable tanto en múltiples tejidos humanos como en líneas celulares (Lossos et al, 2003; Radonić et al, 2004), revisado en ([http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_042279.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042279.pdf)), y en nuestra experiencia previa en muestra de tiroides humano (Garcia-Rendueles et al, 2017).

**Tabla III.18. *Primers* usados en el trabajo.**

	Gen	Secuencia	Tamaño de la amplificación	Temperatura de hibridación
TaqMan	TBP	Fw: 5'- GCCCGAAACGCCGAATAT -3'	67bp	60°C
		Rv: 5'- TTCGTGGCTCTCTTATCCTCATG -3'		
		Pb: 5'- TCCCAAGCGGTTTGCTGCGGTA -3'		
	PIASa	Fw: 5'- TTGGCTCAAACCACTGTGTC -3'	171bp	60°C
		Rv: 5'- GGGTCTCGCTATGTTGCCTA -3'		
		Pb: 5'- CAAGCTGGGTGCGGTGGCTT -3'		
	PIASb	Fw: 5'- ATTTGAGGCTTGCCTTCTCA -3'	155bp	60°C
		Rv: 5'- TACCACCTCCCAAAATCTGC -3'		
		Pb: 5'- TGGGGTACGGTGTGACTGGAATG -3'		
Sybr Green	PIASa	Fw: 5'- CGGTTGATCCTGCTGCTATT -3'	144bp	60°C
		Rv: 5'- AAGATGTTCCAAGCTTCAGTTCA -3'		
	PIASb	Fw: 5'- CGGTTGATCCTGCTGCTATT -3'	182bp	60°C
		Rv: 5'- GCTTGCTGTTAAGGGTGAGG -3'		
	Global PIAS2	Fw: 5'- GCGGATTTTGAAGAGTTGAG -3'	142bp	60°C
		Rv: 5'- AGCCGCTCTTCAATAAATGC -3'		
	WRPE	Fw: 5'- GTCCTTTCCATGGCTGCTC -3'	74bp	60°C
		Rv: 5'- CCGAAGGGACGTAGCAGA -3'		

Para expresar los resultados de cada gen se utiliza el método de la diferencia de umbral de ciclos o  $\Delta Ct$  ( $\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{TBP}}$ ) (Livak et al, 2001). Los genes que son indetectables en alguna muestra X ( $Ct_{\text{gene}} > 40$ ) han sido clasificados de acuerdo con el  $Ct_{\text{TBP}}$ :

- \* Cuando otra muestra con un  $Ct_{\text{TBP}}$  similar posee un  $Ct_{\text{gene}}$  detectable ( $Ct_{\text{gene}} < 40$ ), esa muestra X se considera que tiene una baja expresión y su  $Ct_{\text{gene}}$  es transformado a 42 (2 ciclos por encima del límite).
- \* Si la muestra X posee un  $Ct_{\text{TBP}}$  que es mayor a cualquier otra muestra, se considera que la expresión es técnicamente indetectable y es descartada.

Para determinar el valor final de cada muestra de la PCR cuantitativa se utiliza el método del  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct$  de la muestra del gen- $\Delta Ct$  del control de la técnica) (Livak et al, 2001). Para las comparaciones estadísticas se utiliza la potencia de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Como el ensayo Sybr es más sensible que el ensayo TaqMan, en los experimentos donde la cantidad de muestra disponible era menor se usó el ensayo Sybr. En los demás experimentos se usó el ensayo de TaqMan.

### ***III.10 Estudio de proteínas***

#### **III.10.1 Proteómica 2D**

Los geles 2D separan las proteínas presentes en las muestras en base a su punto isoeléctrico, IP (primera dimensión) y a su peso molecular, MW (segunda dimensión).

Para realizar estos estudios, las proteínas solubles de las muestras de los tirocitos humanos han sido suspendidas en distintos tampones de lisis descritos en la literatura. El mejor tampón de *lisis* fue: 7M Urea (17-1319-01, GE Healthcare), 2M Thiourea (RPN630, GE Healthcare), 4% CHAPS (C3023, Sigma-Aldrich), 40mM DTT (D9779, Sigma-Aldrich).

La concentración de proteína se midió con el RC DCT<sup>TM</sup> Protein Assay Kit II (5000122, Bio-Rad). Se compararon 3 kits comerciales para cuantificar la proteína y este era en el que menos interfería el buffer de lisis. Como proteína de control para la curva estándar se utiliza BSA (*bovine serum albumin*).

Como segunda técnica de equiparación entre muestras, se realizó un *western blot* para proteínas control  $\alpha$ -Tubulina y  $\beta$ -Actina cargando cantidades similares de extracto, para comprobar que las muestras a comparar tenían similares cantidades de proteína total.

En la primera dimensión 50 $\mu$ g de proteínas se rehidrataron en 7M Urea (17-1319-01, GE Healthcare), 2M Thiourea (RPN630, GE Healthcare), 5% CHAPS (C3023, Sigma-Aldrich), 1,2% DeStreak<sup>TM</sup> (GE17-6003-18, GE Healthcare) y 0,5% anfolitos, IPG-Buffer, pH 4-7 (GE17-6000-86, GE Healthcare) y se cargaron en tiras Immobiline<sup>®</sup> Drystrip pH 4-7, 11 cm (GE18-1016-60, GE Healthcare). Después, fueron sometidas a un enfoque de 6000V totales (Ettan IPGphor II IEF system, GeHealthcare).

Antes de realizar la segunda dimensión las tiras se equilibraron en Buffer de Equilibrado (6 M Urea, 17-1319-01, GE Healthcare; 75 mM Tris-HCl pH 8,8; 29,3% Glicerol, G9012, Sigma-Aldrich; 2% SDS, L4509, Sigma-Aldrich; 0,002% azul de bromofenol, 108122, Merck) con 1% de DTT (GE17-1318-0, Sigma-Aldrich) durante 15 min (para reducir las proteínas) y 15 min en Buffer de Equilibrado con 1% de yodoacetamida (RPN6302, GE Healthcare) (para alquilar las proteínas).

Las tiras se cargan en 2D SDS-PAGE al 15% (segunda dimensión) con lo que se consigue separar las proteínas en función del peso molecular.

Los spots se visualizaron por tinción de plata PlusOne Silver Staining Kit (GE17-1150-01, GE Healthcare). Los 3 geles por muestra se escanearon con un densitómetro GS800 (Bio-Rad) y se analizaron con el programa PDQuest (versión 8.0.1, BioRad). Para validar el análisis se usó también el Progenesis SameSpots software (Version 4.5) (Nonlinear Dynamics, NZ).



Los spots seleccionados se digirieron, manualmente, con tripsina utilizando el protocolo descrito por Shevchenko et al, 1996. Las proteínas son reducidas mediante Ditiotreitól (DTT) 10 mM durante 45 min. a 56°C, alquiladas con IA 55mM durante 30min a temperatura ambiente y digeridas con tripsina (Promega, Madison, WI, USA) a una concentración final de 20 ng/zL en 20mM de bicarbonato amónico durante 12h a 37°C. Los péptidos se eluyeron con 40zL de 60% acetonitrilo en 0,5% HCOOH. Las muestras se secaron en un SpeedVac y se almacenaron a -20°C. Para el análisis los péptidos se resuspendieron en 4zL 0,5% HCOOH. Cantidades iguales (0,5 zL) de mezcla de péptidos y de matriz (3 mg CHCA disuelta en 1mL de 50% acetonitrilo en 0,1% TFA) se depositan en la placa anchorChip del MALDI-TOF/TOF.

El análisis por MALDI-TOF se realiza utilizando el espectrómetro de masas 4800 MALDI-TOF/TOF analyzer (Applied Biosystems, CA). Los espectros de masas (MS) son obtenidos en modo reflector positivo, utilizando un láser Nd: YAG a 355nm de longitud de onda y un mínimo de 1.000 disparos por spot. Los espectros son calibrados internamente utilizando las masas peptídicas de la autodigestión de la tripsina o mediante calibración externa con Calibration Mixture 1 (Applied Biosystem, USA). Todos los espectros de MS/MS se realizan mediante selección del precursor con resolución de 300 (FWHM). El análisis automático de los datos de masas se realiza utilizando el software 4000 Series Explorer Software V3.5. Los datos de los espectros de MS y MSMS se combinan usando Mascot software v2.1. (Matrix Science) para realizar la búsqueda contra bases de datos de Humano no redundantes (SwissProt release 56.0) usando como tolerancia de precursor 30 ppm y 0,35 Da para los fragmentos de MSMS permitiendo solo un *missed cleavage*. Solo se consideran identificados aquellos spots con una  $p < 0,05$ .

### **III.10.2 Relación de anticuerpos utilizados**

Los anticuerpos primarios usados en los Resultados de esta tesis y sus especificaciones figuran en la Tabla III.19 y III.20, que incluye

además de las condiciones para *western blot*, las de detección por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

Tabla III.19. Relación de anticuerpos primarios utilizados en la inmunodetección

Anticuerpo Primario	Proveedor	Especie	Dilución y condiciones		
			WB	IF	IHQ
PIASx (D-12)	Sta Cruz Biotech, Sc-166494	m	1:500 I-Block™ ON 4°C+1h RT	1:25	1:500 (PT link)
Anti-PIAS2	Sigma-Aldrich, HPA068792	r	1:1000 I-Block™ ON 4°C+1h RT	1:250	1:2000 (PT link)
Anti-Aurora A antibody	Abcam, ab1287	r	1:4000 I-Block™ ON 4°C+1h RT	1:250	
Phospho-Aurora A (Thr288) (C39D8)	Cell Signalling, 3079	r	1:500 BSA+0.1% Tween20® ON 4°C+1h RT		
gamma Tubulin	Abcam, ab11317	r	1:1000 I-Block™ ON 4°C+1h RT	1:1000	
γ Tubulin (D-10)	Sta Cruz Biotech, Sc-17788	m	1:1000 I-Block™ ON 4°C+1h RT	1:250	
Pericentrin	Abcam, ab4448	r		1:1000	
Bub3 [EPR5319(2)]	Abcam, ab133699	r		1:250	
CREST Human anti-centromere	Antibodies incorporated, 15-234-0001	h		Ready to use	
α Tubulin	Abcam, ab18251	r		1:500	
Phospho-Histone H3 (Ser 10)	Cell Signalling, 679701S	r	1:1000 BSA+0.1% Tween20® ON 4°C+1h RT	1:100	

<b>Histone H3</b>	Cell Signalling, 9715	r	1:1000 I-Block™ ON 4°C+1h RT		
<b>PP2A-Ca/B (O.T.118)</b>	Sta Cruz Biotech, Sc-56950	m	1:1000 I-Block™ ON 4°C+1h RT		
<b>p-PP2A-Ca/B (F-8)</b>	Sta Cruz Biotech, Sc-271903	m	1:500 BSA+0.1% Tween20® ON 4°C+1h RT		
<b>PP1(E-9)</b>	Sta Cruz Biotech, Sc-7482	m	1:1000 I-Block™ ON 4°C+1h RT		
<b>Phospho-PP1α (Thr320)</b>	Cell Signalling, 2581	r	1:500 BSA+0.1% Tween20® ON 4°C+1h RT		
<b>aTubulin</b>	Sigma-Aldrich, T5168	m	1:5000 I-Block™ ON 4°C	1:50	
<b>bActin</b>	Sigma-Aldrich, A5316	m	1:5000 I-Block™ ON 4°C	1:500	
<b>Anti-GAPDH (6C5)</b>	Merck Millipore, CB1001	m	1:5000 I-Block™ ON 4°C		
<b>Phospho-cdc2 (Tyr15) (10A11)</b>	Cell Signalling, 4539	r	1:500 I-Block™ ON 4°C+1h RT		
<b>cdc2</b>	Cell Signalling, 77055S	r	1:500 I-Block™ ON 4°C+1h RT		
<b>Cdc25C (F-5)</b>	Sta Cruz Biotech, Sc-55513	m	1:1000 I-Block™ ON 4°C+1h RT		

**Tabla III.20. Relación de anticuerpos secundarios utilizados en la inmunodetección.**

<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Dilución</b>
<b>Anti-mouse (Polyclonal Rabbit Anti-mouse Ig/HRP)</b>	DAKO, P0260	1:5000 I-Block™
<b>Anti-rabbit IgG (whole molecule)- Peroxidase antibody produced in goat</b>	Sigma-Aldrich, A0545	1:10000 I-Block™
<b>m-IgGk BP-HRP</b>	Sta Cruz Biotech, Sc -516102	1:500 I-Block™
<b>Cy™3 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)</b>	Jackson ImmunoResearch, 711-166-152	1:600
<b>Alexa Fluor® 488 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)</b>	Jackson ImmunoResearch, 715-546-151	1:400
<b>Cy™3 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)</b>	Jackson ImmunoResearch, 715-166-151	1:400
<b>Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488</b>	Invitrogen, A-21206	1:600
<b>Cy™3 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Human IgG (H+L)</b>	Jackson ImmunoResearch, 709-166-149	1:600
<b>EnVision™+ Dual Link System-HRP</b>	DAKO, K4061	Hospital Routine Ready to use

### III.10.3 Extractos de proteína de cultivos

Para extraer las proteínas se utilizan distintos métodos de acuerdo con el tipo de extracto que se necesite. Independientemente del proceso de extracción que se utilice, al final de cada extracción de proteína realizada se guardan 10 $\mu$ L de cada muestra a -20°C para ser cuantificada posteriormente y al menos 5mL del tampón de extracción usado ese día.

#### III.10.3.1 Método de extracción de proteína con tampón de lisis de Triton (*Schlessinger Lysis Buffer*)

Este método se utiliza para obtener extractos citosólicos y proteínas nucleares solubles de las células y tiene la ventaja de que los extractos obtenidos pueden usarse para inmunoprecipitar proteínas. El tampón de *Schlessinger* (Tabla III.21) se puede preparar con antelación y guardarse a 4°C. En el momento de uso se han de añadir los inhibidores de proteasas y fosfatasas.

Tabla III.21. Preparación del tampón de *Schlessinger* de proteínas.

Tampón de <i>Schlessinger</i>	Reactivos y concentración de uso	Stock y referencias
Tampón de lisis	50mM Hepes pH 7,5	Stock 1M en agua. Ajustar el pH con NaOH 10M. H3375, Sigma-Aldrich
	150mM NaCl	Stock 3M en agua. S9888, Sigma-Aldrich
	10% Glicerol	G9012, Sigma-Aldrich
	1% Triton™ X-100	T8787, Sigma-Aldrich
	5mM de EGTA	Stock 0,1M en agua. E5134, Sigma-Aldrich
	1,5mM MgCl <sub>2</sub>	Stock 1M en agua. M8266, Sigma-Aldrich
	Agua destilada	c.s.p.
Inhibidores de proteasas y fosfatasas	2 $\mu$ g/mL Aprotinina	Stock 20 $\mu$ g/mL. A6279, Sigma-Aldrich
	4mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Stock 0,1M en etanol. Se guarda en alícuotas a -20°C. P7626, Sigma-Aldrich
	92 $\mu$ g/mL Ortovanadato sódico (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Stock 93mg/mL en HEPES 1M pH 7,5. Se guarda en alícuotas a -20°C. S6408, Sigma-Aldrich
	20mM Pirofosfato sódico	Stock 0,1M en agua. Se guarda a 4°C. S9515, Sigma-Aldrich

Para evitar que las proteínas se degraden rápidamente, todo el proceso se realiza encima de una bandeja con hielo y en donde todos los reactivos y soluciones están a 4°C.

- \* Las células se lavan con PBS frío, al menos tres veces, y en el último lavado se aspira completamente para evitar que se diluya el lisado proteico.
- \* A cada pocillo se añade el volumen de tampón de *lisis* adecuado de acuerdo con el tipo de placa (Tabla III.22), y se extiende bien por todo el pocillo con un émbolo de una jeringa (*scraper*).

**Tabla III.22. Tampón de *Schlessinger* necesario para cada pocillo.**

Tipo de placa de cultivo	Volumen de tampón de <i>Schlessinger</i>
Multipocillo-24	10µL
Multipocillo-6	40µL
Placa 90mm	100µL

- \* Se incuba durante 20 minutos en hielo.
- \* Con ayuda de un *scraper* se recoge el lisado en tubos eppendorf.
- \* Centrifugar a 12.000rpm (centrifuga 5415R, eppendorf) durante 10 minutos a 4°C.
- \* Se recoge el sobrenadante y se guarda a -20°C.

### III.10.3.2 Cuantificación de la concentración de proteína

Para la cuantificación de la concentración de proteína se usa el kit comercial RC DC™ Protein Assay Kit II (5000122, Bio-Rad). El ensayo de proteínas totales DC de Bio-Rad es una versión modificada del ensayo de Lowry. Es uno de los ensayos más utilizados para proteínas dado que es compatible con muchos detergentes. Como proteína de control para la curva estándar se utiliza BSA (*bovine serum albumin*).

### III.10.4 Electroforesis y transferencia de proteínas

La electroforesis SDS-PAGE se realiza en geles que contendrán distinto porcentaje de acrilamida-bisacrilamida de acuerdo con el peso molecular de la proteína que se desee estudiar. Estos geles poseen dos partes principales: parte superior o *stacking* que tiene un porcentaje fijo muy bajo de acrilamida-bisacrilamida y sirve para concentrar todo el volumen de muestra que sale del pocillo en una línea fina, y así facilitar que, entre todo a la vez en la segunda parte, la parte separadora o *resolving*, que permite la migración de las muestras de acuerdo con su peso molecular. Para detectar la proteína PIAS2 se usarán geles *resolving* al 9 % mientras que para las demás proteínas al 12% (Tabla III.23).

Tabla III.23. Preparación de geles SDS-PAGE.

<i>Stacking</i>	Volumen para 4mL	<i>Resolving</i> al 9%/12%	Volumen para 10mL	Referencias
Agua destilada	2,7mL	Agua Destilada	4,3/3,3mL	
Acrilamida-bisacrilamida 30%	0,67mL	Acrilamida-bisacrilamida 30%	3/4mL	A3574, Sigma-Aldrich
1M Tris-HCl pH 6.8	0,5mL	1,5 M Tris-HCl pH8,8	2,7/2,5mL	
SDS 10%	0,04mL	SDS 10%	0,1mL	L4509, Sigma-Aldrich
10% Amonio persulfato (APS)	0,04mL	10% APS	0,1mL	A3678, Sigma-Aldrich
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	0,006mL	TEMED	0,006mL	T9281, Sigma-Aldrich

Los geles se preparan en el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell de Bio-Rad, con unos espaciadores de 1,5 mm. Primero se hace el *resolving*, al que se añade por encima Isobutanol. Después de 30 minutos se hace el *stacking* en el que se introduce el peine de 15 pocillos del mismo grosor (1,5 mm). Se espera 30 minutos.

El gel se coloca en la cubeta con 1L de tampón de electroforesis 1X (Stock 10X 2L: 60g Tris-Base, T6066, Sigma-Aldrich; 288g de Glicina, G7126, Sigma-Aldrich y 20g SDS, L4509, Sigma-Aldrich, y los pocillos se enjuagan en ese tampón con una jeringuilla para quitarles restos de gel. Las muestras se preparan tomando la misma cantidad de proteína por calle, en general alrededor de 50 $\mu$ g, y se añade el volumen necesario de tampón de carga 5X (8 $\mu$ L). Se igualan las muestras al mismo volumen, 40 $\mu$ L para el peine de 15, con tampón de carga 1X (Stock 5X: 50% glicerol, 10%  $\beta$ -Mercaptoetanol, M3148, Sigma-Aldrich; 0,5% azul de bromofenol, 108122, Merck; 0,4M Tris-HCl pH 6,8 y 10% SDS, L4509, Sigma-Aldrich). Como marcador de peso molecular se utiliza Page Ruler Prestained Protein Ladder (26616, Thermo Fisher Scientific).

Se cuecen las muestras a 95°C por 10 minutos. Se centrifugan ligeramente y se cargan cada una en un pocillo. Los marcadores se localizan en los extremos.

Se procede a la electroforesis del gel a amperaje constante de 15mA hasta el *stacking* y después 30mA en un total de 2 horas y media.

A continuación, se realiza la transferencia del gel a una membrana (Immun-Blot PVDF 0,2 $\mu$ m, 162-0177, Bio-Rad) mediante el sistema semiseco (Z34 050-2, Sigma-Aldrich).

Se utilizan tres tipos de tampón de electroforesis: A, B y C como se indica en la Tabla III.24.

**Tabla III.24. Tampones para la transferencia de geles SDS-PAGE.**

<b>Tampón de transferencia A</b>	<b>Volumen</b>
E-aminocaproic acid 0,4M (A2504, Sigma-Aldrich) + TRIS 0,25M (T6066, Sigma-Aldrich)	100mL
Isopropanol (109634, Merck)	200mL
H <sub>2</sub> O destilada	700mL
<b>Tampón de transferencia B</b>	<b>Volumen</b>
TRIS 1,25M (T6066, Sigma-Aldrich)	20mL
Isopropanol (109634, Merck)	200mL
H <sub>2</sub> O destilada	780mL
<b>Tampón de transferencia C</b>	<b>Volumen</b>
TRIS 0,25M (T6066, Sigma-Aldrich)	200mL
Isopropanol (109634, Merck)	200mL
H <sub>2</sub> O	600mL



Se abre el casete de cristales. La porción *resolving* del gel se separa y se incuba en Tampón A.

- \* Se incuba la membrana de PVDF cortada a tamaño del gel en metanol por 1 minuto (activación) y 5 minutos en agua destilada
- \* Se estabiliza la membrana en tampón B.
- \* Se mojan 3 papeles *whatman* cortados del mismo tamaño que el gel y la membrana (7x8cm) en el tampón C y se colocan sobre la superficie del sistema de transferencia.
- \* Luego se añaden 2 papeles *whatman* (también 7x8cm) mojados en tampón B.
- \* Se coloca encima la membrana desde el tampón B
- \* Por último, se coloca el gel y 3 papeles *whatman* embebidos en tampón A.
- \* Se transfiere el gel durante 2h a amperaje constante que depende de los cm<sup>2</sup> totales: 0,8mA x cm<sup>2</sup>.

### III.10.5 Inmunodetección en membrana

- \* Tras la transferencia se lavó la membrana durante 5 minutos en agua destilada para eliminar restos de acrilamida y tampones.
- \* Se bloqueó la membrana con la solución de bloqueo (Tabla III.25) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. La elección de la solución de bloqueo depende del anticuerpo primario.

Tabla III.25. Soluciones de bloqueo utilizadas en la inmunodetección.

Soluciones de bloqueo	Reactivos	Referencias y Stock
<i>I-Block</i> <sup>TM</sup>	2g/L <i>I-Block</i> <sup>TM</sup>	T2015, Thermo Fisher Scientific
	1X TBS	Stock 10X TBS (0,2M Tris, 1,37M NaCl). Se ajusta el pH a 7,6.
	Se calienta en agitación sin que llegue a hervir hasta su completa disolución	
BSA	5% BSA	A7906, Sigma-Aldrich
	1X TBS	Stock 10X TBS

- \* Todos los anticuerpos se incubaron en agitación durante la noche a 4°C (ver Tabla III.19)
- \* Se lava la membrana 3 veces a intervalos de 5 minutos en solución de lavado (1X TBS y 0,3% Tween20® (P9416, Sigma-Aldrich).
- \* La membrana se incuba durante 1 hora con su anticuerpo secundario específico (Tabla III.20) en solución I-Block™ en agitación. El anticuerpo secundario utilizado viene determinado por el tipo de huésped en el que se generó el anticuerpo primario y permite detectar y amplificar la señal del anticuerpo primario.
- \* Se lava la membrana 3 veces a intervalos de 10 minutos en solución de lavado.
- \* Colocar la membrana sobre una superficie lisa y añadir un volumen de sustrato quimioluminiscente Pierce ECL Western (32106, Thermo Scientific) e incubar durante 1 minuto. El volumen de ECL depende del tamaño de la membrana: 0,125mL de ECL cada cm<sup>2</sup> de membrana.
- \* Para detectar la luz emitida resultante de la reacción del sustrato con la peroxidasa, se coge la membrana con unas pinzas, se retira el exceso de ECL y se coloca en un casete de autoradiografía.
- \* Se utilizan películas fotográficas (FUJI Medical X-Ray Film n°8U) y se revelan a distintos tiempos en función de la señal obtenida con revelador y fijador en una sala oscura.

En algunos casos se requiere incubar la misma membrana con distintos anticuerpos primarios sucesivos, por lo que se necesita un procedimiento que retire el anticuerpo anterior sin que altere la detección del siguiente:

- \* Se lava la membrana 4 veces a intervalos de 5 minutos en solución de lavado.
- \* En un baño caliente a 55°C se incuba la membrana con 25mL de solución de estriado (62,5mM Tris-HCl pH6,8, 2% SDS y 100mM  $\gamma$ -Mercaptoetanol) durante 30 minutos.
- \* Lavar la membrana en agitación 10 veces durante 30 minutos.

- \* Se procede con el bloqueo de la membrana y la incubación con otro anticuerpo diferente.

### III.10.5.1 Inmunodetección de PIAS2 en membrana

Se han probado siete anticuerpos distintos para PIAS2. Estos han sido sometidos a validación utilizando *western blot* con extractos con sobreexpresión de los plásmidos pEGFP-C1-hPIAS2b, Flag-hPIAS2 beta, Flag-hPIAS2 alfa y células sin transfectar, o transfectadas con plásmido vacío. Los resultados se muestran en la Tabla III.26.



**Tabla III.26. Anticuerpos primarios (Ab 1º) de PIAS2 que han sido sometidos a validación.**

Ab 1º	Epítipo	Proveedor	Especie	Dilución y condición en WB	Reconocimiento en peso molecular (kDa) Intensidad de detección	
					Extractos normales	Extractos con sobreexpresión
PIASx (D-12) mPIAS2	TSVDPAAIIPPSLT DYSPFHHHTP C-terminal 518-540aa (Exon12)	Sta Cruz Biotech Sc-166494	m	1:500 I-Block™ ON 4°C+1h RT	p75PIAS2b: intensa p95PIAS2b : menos intensa 140PIAS2b: menos intensa p55PIAS2: muy intensa	Flag-hPIAS2b: muy intensa EGFP-hPIAS2b: muy intensa Flag-hPIAS2a: muy intensa
Anti-PIAS2 rPIAS2	TSVTTTSSHESST HYSSSSSRSETGV ITSSGSNIPDIISL D C-terminal 581-621aa (Exon14)	Sigma- Aldrich HPA068792	r	1:1000 I-Block™ ON 4°C+1h RT	p95PIAS2b: muy intensa p75PIAS2b: sólo cuando muy abundante/muy expuesto p55PIAS2b/ p140PIAS2: borrosas, y sólo cuando sobre-expuesta Human Protein Atlas (HPA): Validado para: -IHQ: Validación ortogonal, 100% específica -Western: Detecta banda única de 95kDa. Validación incierta por no coincidir con peso predicho de PIAS2b (75kDa)	Flag-hPIAS2b o EGFP-hPIAS2b: sólo cuando muy abundante/muy expuesto
Anti-PIAS2	PHSPSPVGSVL LQDTK N-terminal 115-131aa (Exon2)	Abcam, ab4902	r	1:1500 I-Block™ ON 4°C	p60	No detecta sobreexpresión de Flag-PIAS2, ninguna de las dos isoformas
Anti-PIAS2	SSMSSDLPLGLDF LSLIPVDQYQYCP MFLDSLTSPLTA SSTSVTTTSSHES C-terminal 542-591aa (Exones12-14)	Abcam, ab28493	r	1:1000 I-Block™ ON 4°C	p70	No detecta sobreexpresión de Flag-PIAS2, ninguna de las dos isoformas
Anti-PIAS2 [EPR2582 (2)]	N-terminal Péptido sintético dentro de PIAS2 humano entre 100-200 aa. La secuencia exacta es propietaria.	Abcam, ab126601	r	I-Block™ ON 4°C 1:2000	p140 p60	No detecta sobreexpresión de Flag-PIAS2, ninguna de las dos isoformas o
PIAS2	FLDSLTSPLTASS TSVTTTSSHESST HYSSSSSRSETGV ITSSGSNIPDI C-terminal 568-617aa (Exon14)	AVIVA, ARP35735_T 100	r	1:1000 I-Block™ ON 4°C	p70	No detecta sobreexpresión de Flag-PIAS2, ninguna de las dos isoformas
PIAS2	LTSPLTASSTSVT TTSSHESSTHYSS SSSRSETGVITSS GSNIPDIISLD C-terminal 572-621aa (Exon14)	AVIVA, ARP35734_T 100	r	1:1000 I-Block™ ON 4°C	P55	No detecta sobreexpresión de Flag-PIAS2, ninguna de las dos isoformas

### III.10.6 Inmunoprecipitación

Una vez extraída y cuantificada la proteína de extractos celulares:

- \* Se mezclan 125 $\mu$ g de proteína con el anticuerpo contra el que se quiera inmunoprecipitar. Para el anticuerpo PIASx (D-12) se usó 0,1 $\mu$ g y para el anticuerpo Anti-PIAS2 0,5 $\mu$ g.
- \* Se iguala el volumen final de todas las muestras hasta 250 $\mu$ L de tampón de *Shlessinger* y se incuba toda la noche a 4°C en un rotador. Como control se utiliza la misma cantidad de extracto proteico, pero sin anticuerpo y anticuerpo sin extracto proteico.
- \* Se añaden 30 $\mu$ L de proteína G-Sepharosa (G-Sepharosa Gamma Bind, 17-0885-01, GE Healthcare) que previamente han sido bloqueadas con 1mg/mL de BSA (A7906, Sigma-Aldrich), excepto en las inmunoprecipitaciones para identificación proteómica, en 100 $\mu$ L de tampón de *Shlessinger* a cada muestra y se incuban durante 1 hora a 4°C en un agitador rotatorio.
- \* Las muestras se centrifugan a 12.000rpm (centrifuga 5415R, eppendorf) durante 1 minuto a 4°C y se descarta el sobrenadante.
- \* Se añaden 1mL de tampón HNTG frío (Tabla III.27) y se centrifugan a 12.000rpm (centrifuga 5415R, eppendorf) durante 2 minutos a 4°C.

Tabla III.27. Solución de lavado de los inmunoprecipitados.

Componentes tampón HNTG
20mM Hepes pH 7.5
15mM NaCl
10% Glicerol
1% Triton X-100
Agua destilada

- \* Se descarta el sobrenadante y se realizan 5 lavados con el tampón HNTG.

- \* Eliminar el mayor volumen residual posible y cocer las muestras a 95°C durante 10 minutos con 20 $\mu$ L de 1,5X de tampón de carga (Stock 5X)
- \* A continuación, se procede con el protocolo de *western blot* convencional cargando estos extractos en el gel.

### III.10.6.1 Inmunoprecipitación para identificación proteómica

Para la identificación del inmunoprecipitado por proteómica se sigue el protocolo de la inmunoprecipitación normal pero adaptado de la siguiente forma:

- \* En tubos de 2mL (Protein LoBind Tubes, eppendorf, 0030108132) se mezclan 250 $\mu$ g de proteína (muestra en mitosis) con 0,2 $\mu$ g del anticuerpo contra PIAS2 (PIASx (D-12)). Como control se utiliza una réplica con extracto proteico y con la misma cantidad de inmunoglobulina de idéntico origen e isotipo que el anticuerpo primario de PIAS2, pero no inmune, IgG2a (Sigma-Aldrich, M5409 1MG). Se hacen 6 replicados por cada condición.
- \* Se iguala el volumen final de todas las muestras hasta 500 $\mu$ L de tampón de *Shlessinger* y se incuba toda la noche a 4°C en un agitador rotatorio.
- \* Al día siguiente se añaden 60 $\mu$ L de proteína G-Sepharosa (G-Sepharosa Gamma Bind, 17-0885-01 GE Healthcare) en 200 $\mu$ L de *Buffer* de *Shlessinger* a cada muestra y se incuban durante 1 hora a 4°C en un agitador rotatorio.
- \* Las muestras se centrifugan a 12.000rpm (centrifuga 5415R, eppendorf) durante 1 minuto a 4°C y se descarta el sobrenadante.
- \* Se añaden 1mL de tampón HNTG frío (Tabla III.27) y se centrifugan a 12.000rpm (centrifuga 5415R, eppendorf) durante 2 minutos a 4°C.
- \* Se descarta el sobrenadante y se realizan 5 lavados con el tampón HNTG.
- \* En el último lavado se juntan los 6 tubos de cada muestra en un solo tubo.

- \* 1/10 de la muestra se cuecen a 95°C con 30 $\mu$ L de 1,5X de tampón de carga (Stock 5X) para proceder a continuación con el protocolo de western blot convencional.
- \* La restante muestra se utiliza para la identificación de proteínas por técnicas proteómicas (LC-MS/MS). Este experimento se repitió 5 veces. Para este estudio se han realizado inmunoprecipitaciones con 5 muestras y sus 5 controles.
- \* Todo este procedimiento es hecho en condiciones estériles y libre de queratinas.

### III.10.6.2 Espectrometría de masas: digestión triptica del IP

El resultado de la inmunoprecipitación se hirvió en presencia de SDS a 95°C 5 min para romper la unión anticuerpo proteína y se concentró en un gel SDS-PAGE al 10%. El gel se dejó correr hasta que el frente entró en 3 mm del gel *resolving*. La banda de proteína se visualizó con una tinción fluorescente (Sypro-Ruby, Lonza), se cortó y se sometió a digestión triptica siguiendo el protocolo estándar de Shevchenko et al, 2006 con pequeñas modificaciones.

La banda fue lavada con bicarbonato amónico 50mM en 50% de metanol (*HPLC grade*) y deshidratada en acetonitrilo (*HPLC grade*). El gel fue reducido en ditioneol 10mM (Sigma-Aldrich) en bicarbonato amónico 50mM (Sigma-Aldrich) a 56°C durante 30min y alquilado con yodoacetamida 55mM (Sigma-Aldrich) en bicarbonato amónico 50mM durante 20min a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, las piezas de gel se lavaron nuevamente con bicarbonato amónico 50mM en metanol al 50% y se deshidrataron con acetonitrilo.

La digestión triptica fue llevada a cabo por la adición de tripsina porcina modificada (Promega) a una concentración final de 20 ng/ $\mu$ L en bicarbonato amónico 20mM durante 16h a 37°C. Previamente las piezas de gel se rehidrataron a 37°C durante 1min.

Los péptidos tripticos generados se extrajeron mediante tres incubaciones de 20min en 40 $\mu$ L de 60% acetonitrilo y 0,5% ácido

fórmico, fueron agrupados y secados al vacío en un SpeedVac para ser almacenados a -20°C hasta su uso.

### III.10.6.3 Espectrometría de masas: Ensayos cualitativos DDA (data-dependent acquisition) y LC-MS/MS (triple TOF 6600 SCIEX)

En esta técnica los péptidos digeridos se resuspendieron en 20  $\mu$ L de la fase móvil A (H<sub>2</sub>O con 0,1% de ácido fórmico calidad LC-MS), mediante sonicación durante 10min. Se inyectaron 4 $\mu$ L de cada muestra en un *loop* (10 $\mu$ L/min) donde la mezcla peptídica se resuspendió correctamente en la fase móvil A (H<sub>2</sub>O con 0,1% de ácido fórmico calidad LC-MS). Los péptidos pasaron a una precolumna de fase reversa basada en sílica YMC TRIART C18, 5 x 0,5 mm, 3 mm de tamaño de partícula y 120Å de tamaño de poro (YMC Technologies) donde se eliminaron posibles contaminantes que pueden dañar la columna. Esta precolumna está conectada online a una columna de captura YMC-TRIART C18, 150 x 0,30 mm, con un tamaño de partícula de 3 mm y un tamaño de poro de 120Å (YMC Technologies) donde los péptidos se van separando por polaridad a una velocidad de 5 $\mu$ L/min. El gradiente de elución de los péptidos va desde un 2% hasta el 90% de fase móvil B (Acetonitrilo (ACN) con 0,1% ácido fórmico calidad LC-MS).

La adquisición de datos se realizó en un sistema Triple-TOF 6600 (SCIEX) usando un flujo de trabajo dependiente de datos (DDA) mediante el software Analyst TF 1.7.1 (SCIEX). Las condiciones de las fuentes e interfaces que se usaron son las siguientes: voltaje flotante del ion spray (ISVF) de 5500V, Gas coritna (CUR) de 25, energía de colisión (CE) de 10 y gas de fuente de iones 1 (GS1) de 25. Para la elección de los iones se estableció como criterio seleccionar aquellos cuyo cociente masa/carga (m/z) sea mayor que 350 y menor que 1400 con estados de carga de +2-5, una tolerancia de masa de 250 ppm y un umbral de abundancia de más de 200 cps. Los iones diana del análisis anterior se eliminan cada 15 segundos. El equipo se calibra automáticamente cada 4 horas usando una mezcla de péptidos tripticos conocidos como es el pepCalMix (SCIEX).



Después de la adquisición de los MS/MS, los archivos se procesaron con el software ProteinPilot™ 5.0.2 (SCIEX) usando el algoritmo Paragon™ (5.0.2) para la búsqueda en la base de datos y Progroup™ para la agrupación de los datos. Las búsquedas se realizaron usando una base de datos Uniprot (Uniprot, 2019; <https://www.uniprot.org/uniprot>) específica de Humano (UniProt release 2016-2, Swiss-Prot). Se hicieron 2 tipos de búsqueda: 1) de los archivos de los MSMS (.wiff) obtenidos para cada muestra de forma individual 2) de los archivos MSMS de todas las muestras del mismo grupo conjuntamente. En el primer caso se obtienen las proteínas identificadas de forma individual para cada muestra con los péptidos obtenidos para cada proteínas, pero el ProteinPilot™ tiene la opción de lanzar conjuntamente los archivos correspondientes a un mismo grupo de muestras y agrupar las proteínas identificadas sumando los péptidos obtenidos en cada muestra de la misma proteína generando un único archivo con las proteínas comunes y no comunes que cumplan los criterios de exclusión para las muestras del mismo grupo.

El ProGroup™ Algorithm informa de dos tipos de puntuaciones para cada proteína: *Unused ProtScore* y *ProtScore total*. El *Unused ProtScore* es una medida de toda la evidencia de péptidos para una proteína que no se explica mejor por una proteína de mayor rango, mientras que el *ProtScore total* es una medida de la confianza de identificación de proteínas teniendo en cuenta todas las pruebas de péptidos para una proteína. Las proteínas identificadas fueron agrupadas por el software para minimizar la redundancia, y se usó *Unused ProtScore* como un verdadero indicador de la proteína o proteínas dadas dentro de un grupo. Los criterios de aceptación para aceptar a una proteína como identificada para los análisis estadísticos posteriores fueron: *Unused ProtScore* >1,3 (medida de si sus espectros son únicos o pueden corresponder a otras proteínas) con al menos un péptido identificado con >95% de confianza, y Global FDR <1%, 92,6% *Confidence* (Xiao et al, 2010). Las FDR para las identificaciones de proteínas se calcularon mediante la fórmula:  $FDR = (2 \times reverse) / (forward + reverse)$ . Al resultado obtenido para el inmunoprecipitado con PIAS2 se han restado las proteínas que eran comunes con el control usando el programa FunRich v 3.1.3.

Las proteínas candidatas se revisaron cuidadosamente en el ID de proteína del software ProteinPilot y se analizaron en el programa Cytoscape v 3.6.1 (Shannon et al, 2003; <https://cytoscape.org/>) usando la base de datos para el estudio de las funciones biológicas Reactome v 68 (Fabregat et al, 2018; <https://reactome.org/>). Para el diseño de las redes de asociación de proteínas funcionales se usó el programa STRING v11 (Szklarczyk et al, 2015; <https://string-db.org/>).

### III.10.7 Tratamiento con lambda fosfatasa

La proteína Lambda fosfatasa es una proteína fosfatasa dependiente de  $Mn^{2+}$  con actividad hacia los residuos de serina, treonina y tirosina fosforilados (Cohen et al, 1989; Zhuo et al, 1994).

Para estos experimentos, se adaptaron los protocolos de los trabajos de Husberg et al, 2012 y An et al, 2018.

- \* Se extrajo la proteína según el apartado III.10.3, utilizando el tampón de *Schlessinger* con la excepción que no se añade el inhibidor de fosfatasas, el Ortovanadato sódico ( $Na_3VO_4$ ).
- \* Una vez extraída la muestra se cuantifico la concentración de la proteína según el apartado III.10.3 Para cada condición se usaron 40 $\mu$ g . A la muestra tratada con lambda fosfatasa (40 $\mu$ L) , se añadieron 400 unidades de la proteína lambda fosfatasa (P0753, New England Biolabs), 5 $\mu$ L de 10  $\times$  NEBuffer PMP y 1 mM de  $MnCl_2$  e incubado a 30°C durante 30 min.
- \* Como muestras control se han usado las mismas muestras que han sido tratadas de forma idéntica, pero sin añadir la enzima.
- \* A la continuación se cuecen a 95°C con tampón de carga 1X (Stock 5X) para a continuación, se proceder con el protocolo de *western blot* convencional.

### III.10.8 Inmunohistoquímica

Toda la inmunohistoquímica se realizó en secciones de tejido fijado con formalina, incluido en parafina (FFPE) según el protocolo estándar utilizado en clínica con el sistema EnVisión FLEX System (Dako). La dilución de los anticuerpos y condiciones se resumen en la Tabla III.19 y Tabla III.20.

En un experimento se realizaron secciones más gruesas (8 $\mu$ m) de muestras de tejido no fijado, conservadas en congelación en la resina OCT:

- \* Se fijan las secciones con Formalina 4% durante 30 minutos.
- \* Se lavan con PBS 3 veces y se incuban con 0,1% de Triton durante 1 hora en hielo.
- \* Transcurrido este tiempo se lavan las secciones 3 veces con PBS
- \* Se incuban las secciones con el anticuerpo mPIAS2 (Tabla III.19) en PBS (volumen total 500 $\mu$ L por cada sección) toda la noche a 37°C.
- \* Transcurrido ese tiempo se lava 3 veces con PBS.
- \* Se incuban las secciones con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla III.20) (volumen total 500 $\mu$ L en cada sección) durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- \* Lavar con PBS 3 veces.
- \* Montar las secciones con medio de montaje (Fluoro-Gel, 17985-10, Electron microscopy Sciences) con 2mg/mL de DAPI (D9542, Sigma-Aldrich) colocando un cubre objetos.
- \* El análisis y captura de las imágenes se realiza empleando un microscopio confocal de banda ancha (Leica TC SP5-AOBS) como se describe en el apartado siguiente.

### III.10.9 Inmunofluorescencia

Para este procedimiento se usó el protocolo adaptado del trabajo de Thul et al, 2017 (HPA, [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)):

- \* En placas de multipocillos de 96 con fondo de cristal (Greiner *Sensoplate, glass bottom microplates* 655892) se siembran 5.000 o 10.000 para experimentos de sincronización de las células en mitosis con doble Timidina y transfección de dsRNAi. Para los experimentos sin tratamientos se siembran las células según la Tabla III.2.
- \* Se lavan las células con medio de cultivo
- \* Se fijan las células con 200 $\mu$ L de Formalina 4% durante 30 minutos
- \* Se lavan con PBS 3 veces y se incuba con 0.1% de Triton durante 1 hora en hielo
- \* Transcurrido este tiempo se lavan las células 3 veces con PBS
- \* Incubar las muestras con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla III.19) en PBS (volumen total 55 $\mu$ L en cada pocillo) toda la noche a temperatura ambiente. En el caso de los cultivos primarios T-UC1, T-UC2 Y T-NT2 para el anticuerpo mPIAS2 se deja toda la noche a 37°C.
- \* Lavar con PBS.
- \* Se incuban las muestras con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla III.20) (volumen total 55 $\mu$ L en cada pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- \* Lavar con PBS 3 veces.
- \* Añadir medio de montaje (Fluoro-Gel, 17985-10, Electron microscopy Sciences) con 2mg/mL de DAPI (D9542, Sigma) durante 10 a 20 minutos y después rellenar el pocillo con 80 % de Glicerol en PBS estéril.
- \* El análisis y captura de las imágenes se realiza empleando un microscopio confocal de banda ancha (Leica TC SP5-AOBS) con láser blanco (470-670nm) y láser ultravioleta, a través del objetivo 63X *oil* con apertura numérica (NA) 1,4 y el software

LAS AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence) haciendo planos seriados cada 0,5 micras de forma secuencial bidireccional. Las pasadas se representan en la Tabla III.28 Se recogían juntos el canal UV y la luz transmitida.

**Tabla III.28. Pasadas correspondientes a cada canal con su respectivo fluoróforo y longitudes de onda de excitación y emisión con los láseres.**

Canal	Fluoróforo	$\lambda_{Ex}$ (nm)	$\lambda_{Em}$ (rango, nm)	Pasadas (Line/ Frame average)
Ch1	DAPI	405	414 - 479	2/2
Ch2 (Trans Scan-BF)	Transiluminación Scan con filtro BF			
Ch3	Alexa Fluor 488	492	499 - 547	4/3
Ch4	Cyanine 3	552	565 - 624	4/3

### **III.11 Estudios *in vivo***

#### **III.11.1 Generación de las poblaciones de células para medir Bioluminescencia**

Para los estudios *in vivo* se generó una población con transducción del retrovirus MI-Luciferase-IRES-mCherry en los cultivos primarios de anaplásico (T-UC1- MI-Luciferase-IRES-mCherry), (ver apartado III.7) La población expresa RFP (proteína roja fluorescente) como control de infección de las células y luciferasa que permite seguir posteriormente el crecimiento de los tumores en los ratones.

#### **III.11.2 Modelo ortotópico de xenoimplante de células de carcinoma anaplásico de tiroides de pacientes en ratón NOD-SCID (oPDX)**

Se generó un grupo de 9 ratones hembra NOD-SCID (NOD.CB-17-Prkdc scid/Rj, Janvier Labs) inmunodeprimidos (Hidalgo et al, 2014; Byrne et al, 2017) (5 controles y 4 tratados) con 7 semanas de edad en el momento de la inoculación.

Las células se implantaron de forma ortotópica en el lóbulo derecho de la glándula tiroides mediante cirugía del cuello con una jeringuilla Hamilton con aguja roma de 3 cm de longitud (100 $\mu$ L /30mm/PST3 (1710N, Hamilton).

Para la técnica quirúrgica de implantación decidimos estandarizar nuestra propia metodología. El grupo de Sewell et al, 2013 estandarizó una técnica para la implantación de xenografts de líneas celulares de tiroides humanas, que incluía la sección de los músculos laríngeos para el acceso a la tiroides. Nuestro grupo decidió que esta técnica era demasiado agresiva para obtener un modelo relevante de carcinoma de tiroides humano ya que disrumpía las estructuras musculares que rodean a la tiroides, generaba inflamación y podía alterar la fisiología endocrina del animal receptor.

Nuestra técnica quirúrgica fue como sigue:

Tras realizar un corte vertical de la piel a la altura de la tráquea de unos dos centímetros de longitud, y cortar el tejido celular subcutáneo, apartando la glándula submaxilar. Se deja en el centro del campo operatorio la tráquea y los músculos peritraqueales. Nuestra vía de acceso fue siempre derecha y exterior, evitando absolutamente la tráquea. Con unas pinzas finas se levanta el músculo esternotiroides derecho hasta notar ligera tensión en la cápsula y la fascia traqueal. Con un ángulo de aproximadamente 20° respecto a la tráquea, se introduce la aguja de la jeringa por debajo del músculo unos 0,3 cm y se deposita 25 $\mu$ L de la suspensión celular. De esta forma, la aguja roma de la jeringa con las células iba penetrando entre la fascia muscular y entrando en la capsula de la tiroides justo debajo del músculo esternotiroides.

El protocolo paso a paso es de la siguiente forma:

- \* Dos días antes de su implantación en el ratón se tripsinizan las células de la población con tripsina 1X, se cuentan en una cámara de Neubauer y se resiembran con una dilución 1:2. Esto se hace para mantener su estado activo y para hacer una estima del número de células disponibles.
- \* El día de la implantación, se lavan las células dos veces con PBS y se tripsinizan con tripsina 1X, que se neutraliza con medio con

suelo. Se cuentan en una cámara de Neubauer y se toman las necesarias para la inyección y se centrifugan durante 5 minutos a 300g/1.000 rpm a temperatura ambiente. El pellet se resuspende en el volumen residual con pequeños golpecitos y se añade un volumen aproximado de Matrigel (E1270, Sigma-Aldrich), que se considera queda al 50% en una relación de  $1 \times 10^6$  células/25  $\mu$ L finales. Se debe mantener la mezcla en hielo (4°C) hasta su uso para evitar la solidificación del Matrigel.

- \* Los ratones se anestesian con un volumen de Ketamina/Xilacina (Tabla III.29) de acuerdo con su peso corporal (100  $\mu$ g por cada 10g). Se comprueba que están correctamente anestesiados mediante reflejo podal y palpebral antes del procedimiento.

**Tabla III.29. Preparación de la anestesia Ketamina/Xilacina para los ratones.**

Componentes	Volumen	Stock	Referencia
Ketamina (Ketamidol)	1mL	100mg/mL	Richter pharma
Hidrocloruro de xilacina (Rompun)	250 $\mu$ L	20mg/mL	Bayer
Suero fisiológico	6mL	0,9% NaCl	Vitulia

A partir de este punto, la inyección del preparado de células se realizó en los siguientes pasos:

- \* Aplicar crema lubricante en cada ojo (Lipolac 2 mg/g, Angelini)
- \* Se coloca el ratón sobre una alfombrilla térmica para disminuir la pérdida de calor.
- \* Depilar el campo quirúrgico con crema depilatoria (Veet® crema depilatoria con aloe vera), limpiando la zona con una gasa y agua templada para retirar los restos de crema y desinfectar la zona con Betadine® antes de la cirugía.
- \* Se fijan las cuatro extremidades con esparadrapo para evitar la movilidad del ratón durante la cirugía
- \* Se procede a la inoculación de las células. Para ello, se realiza una incisión vertical de aproximadamente 1 centímetro en la región media del cuello con un bisturí. Con la ayuda de una

pinza, separar las glándulas submaxilares hasta visualizar la tráquea, con sus músculos y fascias.

- \* Se levanta el músculo esternotiroideo. Con la ayuda de la jeringuilla Hamilton, mantenida en frío para evitar la solidificación en el interior, inocular 25 $\mu$ L de la mezcla de células, teniendo cuidado en no inyectarlas en la tráquea o traspasar con la aguja la glándula.
- \* Una vez inoculado, esperar unos segundos antes de retirar la aguja para favorecer la solidificación del Matrigel y así evitar la difusión de la mezcla a los tejidos contiguos.
- \* Cerrar la incisión con hilo de sutura de 4-0 (Mersil Soie, Ethicon) con dos-tres puntos independientes.
- \* Limpiar de nuevo la zona de la incisión con Betadine y aplicar la crema Blastoestimulina. Esta se seguirá aplicando todos los días durante una semana.
- \* Administrar Ketoprofeno 2,5 mg/kg (Orudis 100mg solución inyectable; stock 1mg/mL en suero salino, Sanofi-Aventis) por vía subcutánea para aliviar el posible dolor derivado de la cirugía.
- \* Cuando este despierto y totalmente recuperado el ratón se devuelve a la caja.

### **III.11.3 IVIS: Ensayo de medición de bioluminiscencia *in vivo***

Inyectadas las células en los ratones, se realiza un análisis cinético de la actividad luciferasa, una vez a la semana, en un sistema de captura de imágenes in vivo (*IVIS Spectrum imaging system* (Perkin Elmer)).

De forma previa a la medición, se debe depilar la zona del cuello usando crema depilatoria para con el objetivo de minimizar la posible interferencia en la señal. Es importante realizarlo el día anterior a la medición porque la propia crema depilatoria emite señal.



La medición se realiza en los siguientes pasos:

- \* Colocar el animal en la cámara de inducción regulando el vaporizador de Isoflurano al 3-4% y el flujo de oxígeno a 0,5-1L/min).
- \* Colocación de los ratones boca arriba en la cámara del IVIS para realizar la captura de señal regulando la sedación con Isoflurano al 2% y oxígeno a 0,5-1L/min.
- \* Inyectar la luciferina (122799, XenoLight D-Luciferin, Perkin Elmer) por vía intraperitoneal a una concentración de 300mg/kg (stock 30 mg/mL en DPBS sin Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, pasado por un filtro con un poro de 0,2 micras y guardado a -80°C). Se adquiere la primera imagen justo después de la inyección de luciferina para obtener el tiempo 0 post-inyección.
- \* Continuar tomando imágenes cada 5 minutos hasta un tiempo máximo de 25-30 minutos (o hasta que la emisión de señal comienza a disminuir).
- \* Desconectar el vaporizador de Isoflurano y mantener el oxígeno a 0,5-1 L/min durante unos segundos para favorecer la recuperación de los animales.
- \* Una vez obtenidas todas las imágenes se realiza la cuantificación de la señal, representado el valor máximo de señal en fotones/segundo con el programa Living Image 3.2 Perkin Elmer (Inoue et al, 2010; Stewart et al, 2017).

Se realizó un seguimiento del crecimiento del tumor semanalmente durante 5 semanas antes de iniciar el tratamiento para comprobar el desarrollo del tumor en el animal.

### **III.11.4 Tratamientos dsRNAi *in vivo***

A las 4 semanas los animales son distribuidos en grupos de 4 o 5 por caja tras la inyección de la suspensión celular. Y de esta forma se mantienen hasta la semana 7 donde comienza el tratamiento. En todos ellos se generaron tumores. A partir del tratamiento, los animales se mezclaron de forma randomizada a la hora del tratamiento y así se mantuvieron hasta el final del experimento.

Para que la vida media de los dsRNAi sea suficiente, decidimos mezclarlos con un vehículo, el Atelocolágeno (AteloGene Koken, Cosmobio). El Atelocolágeno deriva del colágeno tipo I de la piel de ternera tratada con pepsina y su inmunogenicidad es baja (Stenzel et al, 1974). El Atelocolágeno ha sido usado ampliamente en clínica (Ochiya et al, 2001). El Atelocolágeno está descrito como un vehículo que forma un complejo con las moléculas de DNA que eran eficientemente traducidas en cultivos celulares de mamífero (NEC8 y HepG) (Honma et al, 2001) y que permitía la liberación prolongada y la expresión de DNA plasmídico *in vivo* en ratones adultos normales (Ochiya et al, 1999).

En 2004 se publicó un trabajo donde el Atelocolágeno formaba complejos con siRNA que eran introducidos eficientemente en células permitiendo el silenciamiento génico a largo plazo. Como está cargado positivamente, el Atelocolágeno forma complejos por carga eléctrica cuando se mezcla con los ácidos nucleicos, siempre que ambos estén en proporciones y concentraciones apropiadas. Estos complejos protegen de la degradación de los ácidos nucleicos por las nucleasas (Minakuchi et al, 2004). En un modelo de xenografts ortotópicos con células de cáncer de testículo, la administración intratumoral de atelocolágeno con siRNA contra el mRNA del factor de crecimiento de fibroblastos 4 (Ffg4) se encontró una inhibición más eficaz del crecimiento del tumor comparado contra el mismo siRNA asociado a lípidos (Minakuchi et al, 2004).

Como nuestro objetivo era tratar los ratones por vía sistémica se eligió el AteloGene® Systemic Use (257KKN-1395, AteloGene Koken, Cosmobio) basándonos en otros trabajos donde los tratamientos por vía sistémica habían funcionado eficazmente en modelos ortotópicos de ratón (Takei et al, 2004; Takeshita et al, 2005; Takahashi et al, 2013).

Cuando los tumores alcanzaron grandes masas en el cuello (5 semanas) se tratan 5 ratones con ns-dsRNAi y 4 ratones con PIAS2b dsRNAi-1 con una dosis de 200µL de 40zM por inyección/ratón. Esta concentración se basó en trabajos previos publicados con siRNA combinado con AteloGene para tratar xenografts de líneas celulares de

cáncer de próstata por vía intravenosa (Azuma et al, 2010; Sasaki et al, 2010).

El tratamiento se prepara según el kit (AteloGene Koken, Cosmobio). Cada kit permite hacer 5 dosis del control y 5 dosis del tratamiento:

- \* Se prepara el dsRNAi ajustándolo a una concentración de 40z M con 1XsiRNA buffer (diluir 10XsiRNA buffer en agua esterilizada) hasta un volumen de 600zl.
- \* En otro tubo se pasan 600zl del AteloGene en hielo con una jeringa con una aguja de 18G.
- \* Se mezclan los dos reactivos (ns-dsRNAi + AteloGene o PIAS2b dsRNAi-1 + AteloGene) y se ponen a agitar en un agitador rotatorio a 4 rpm durante 20 minutos a 4°C.
- \* Se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 minuto a 4°C para eliminar las borbuja.
- \* Se pasa la mezcla a una jeringa con una aguja de 18G y se sustituye por una aguja de 26G. Hasta que se administre en los animales se mantiene refrigerada en hielo.

Los ratones NOD-SCID son inyectados por vía intravenosa en la cola con un volumen de 200μL mantenido a 4°, dos veces a la semana durante 3 semanas. En el comienzo de los tratamientos se empezó por anestesiarse los ratones con Isoflurano al 2% y oxígeno a 0,5-1L/min antes de la inyección intravenosa. Se murieron ratones anestesiados mientras eran inyectados debido a un problema de rensión vascular por la conjunción de inyección de un volumen a 4° y la anestesia. Antes esto, se cambió el protocolo y se inyectaron sin anestesiarse mediante ligera restricción de movimientos (*restrainer*). Con este nuevo procedimiento no se han muerto más ratones hasta final del experimento. Esta descrito que la combinación de la inyección de grandes volúmenes por las venas de la cola junto con la anestesia puede provocar complicaciones y muerte en algunos ratones. (Lewis and Wolff, 2005; Kovacsics and Raper, 2014).

El crecimiento de los tumores ha sido monitorizado por bioluminiscencia con el aparato IVIS todas las semanas hasta la semana 9.

Todos valores de las mediciones de bioluminiscencia para cada animal son ajustados al tiempo inmediatamente antes del inicio del tratamiento (100%) y recalculados de forma correspondiente. Se representan curvas longitudinales conectando las medidas de ratones individuales y el grupo *smooth* (LOWESS).

LOWESS (*LOcally WEighted Scatter-plot Smoother*) es un método de regresión ponderada localmente no paramétrico para generar una curva *smooth* entre dos grupos de datos (Jacoby, 2000). Para generar este tipo de curvas se usó el programa Prism 8 (Graphpad Software Inc.). En el programa las curvas Lowess son generadas según los algoritmos: Q (la proporción de los datos que se utilizan para suavizar un punto específico o también puede considerarse como el número de puntos vecinos a considerar cuando se ajusta la curva); se ha elegido el *smoothing* medio que corresponde a 10 puntos. W, función de weighting utilizada para la regresión local ponderada donde usa la fórmula:  $W = 1 / (1 + |\Delta X|^3)^3$ . Lambda, el orden del polinomio que se utiliza para el ajuste; programa usa una línea recta.

Graphpad Prism genera la curva como una serie de segmentos de línea. El programa siempre genera una curva LOWESS con al menos cuatro veces más segmentos de línea que el número de puntos de datos, y no puede reducir el número de segmentos por debajo de este valor. El número de segmentos elegidos fueron 40. Los intervalos de confianza no se aplican a las líneas de ajuste LOWESS debido a que no se basan en la regresión (Chambers et al, 1983).

Para la evaluación final de la respuesta final se usaron los criterios de análisis de crecimiento de cáncer en humanos RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) (v1.1) (Eisenhauer et al, 2009), que calcula el tamaño tridimensional a partir de Tomografía Computerizada (TC) aplicados a nuestra bioluminiscencia en ratones (RECIST-like). Específicamente en RECIST se aplicaron los criterios para tumores en ganglios linfáticos,

puesto que el tipo de lesión era semejante a lo detectado en nuestros ratones, y hay imposibilidad de calcular el volumen real de la lesión. También se han utilizado los criterios Choi, diseñados para detectar el crecimiento tumoral a partir de volúmenes obtenidos a partir de la intensidad de TC con contraste (Choi et al, 2004; Choi et al, 2007; Tirkes et al, 2013), aplicados a nuestra señal de bioluminiscencia en ratones (Choi-like).

Las categorías utilizadas en estas escalas para tumores humanos son PD= *Progressive disease*; SD= *Stable Disease*; PR= *Partial response*. Los criterios de RECIST (v 1.1) que son aplicados a los nódulos linfáticos consideran que los tumores tienen un *Progressive Disease* cuando tienen un aumento  $\geq 20\%$  (Eisenhauer et al, 2009). En los criterios Choi los tumores tienen una respuesta de *Partial response* cuando la disminución en la atenuación tumoral es  $\geq 15\%$  (Choi et al, 2004; Choi et al, 2007; Tirkes et al, 2013). Se mantuvieron las categorías y criterios en los ratones.

### **III.11.5 Terminación del experimento *in vivo***

Una vez llegado el final del tratamiento se esperó una semana más y después se procedió al sacrificio de los animales según las normas legales de eutanasia.

Los ratones son anestesiados profundamente con Ketamina/Xilacina (200 $\mu$ L/10g ) y los tumores son extirpados mediante cirugía. Se realiza una primera valoración *in situ* para determinar la afectación del crecimiento tumoral a otras regiones.

Se realiza un examen *ex vivo* de las dimensiones del tumor con un calibre de precisión y en la mayor brevedad posible se introduce en formalina para su posterior análisis histológico.

Se realiza un examen macroscópico de los órganos más susceptibles de metástasis como los pulmones, cerebro, corazón y hígado.

### **III.11.6 Anatomía patológica de las piezas quirúrgicas disecadas conteniendo los oPDX**

Las piezas se fijan con formalina y se incluyen en parafina según procedimiento habitual (FFPE). Se tallan las piezas por el patólogo según procedimiento habitual hasta llegar a la zona media. A partir de ahí se seccionan hacia arriba y hacia abajo. Las secciones se tiñen con hematoxilín-eosina (H-E) o inmunohistoquímica.

Por inmunohistoquímica se compararán las características histológicas con anticuerpos validados clínicamente para el diagnóstico del carcinoma anaplásico de tiroides. Se han analizados los marcadores: CK8+CK18, CK AE1AE3, PAX8, TTF1, Ki67, TG y p53.

Para el marcador Ki67 se hicieron contajes automáticos según la rutina hospitalaria usando el programa *Automated Cellular Imaging System* (ACIS III) de Dako.

Las secciones de H-E además de para observación microscópica general, se han utilizado para contar el número de células muertas del carcinoma (fondo eosinofílico (rosa intenso y núcleo condensado negroide central) comparando el grupo control frente al tratado. Los contajes se han realizado con el programa FiJi (ImageJ 1.52) (<https://fiji.sc/>).

### **III.12 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se usó el programa Prism 8 (Graphpad Software Inc.).

Todos los resultados son representados mediante la media  $\pm$  SEM. Las muestras que demostraban fallos evidentes para la metodología usada han sido excluidas (exclusión técnica por alteración del protocolo; evento raro en esta tesis).

Los experimentos *in vitro* se realizan como mínimo tres veces con 3-6 replicados por condición. En cada grupo de resultados, se realizó primero un test de normalidad. Para ello se usaron el test Kolmogorov-Smirnov donde el n tiene que ser igual o mayor que cinco, el test

Shapiro-Wilk que usa un  $n$  igual o mayor a tres y el test D'Agostino & Pearson donde el  $n$  tiene que ser igual o mayor que diez.

Todas las comparaciones entre grupos de datos que siguen distribución normal se realizaron con el T test para comparar entre dos grupos, o con ANOVA para la comparación entre más de dos grupos. En el caso de distribuciones no normales, se usaron el test de Mann-Whitney para comparar entre dos grupos y Kruskal-Wallis para la comparación entre más de dos grupos respectivamente.

Los datos con  $p < 0.05$  han sido considerados estadísticamente significativos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).







## **IV. RESULTADOS**





#### ***IV.1 Estudio de expresión diferencial mediante 2D-proteómica***

Nuestro grupo estableció un sistema de cultivo *in vitro* de células foliculares de tiroides humano, h7H, donde se cuida cada etapa del método de cultivo para conseguir que 1) las células crezcan; 2) las células mantengan el fenotipo que poseen *in vivo* (Bravo et al, 2013). Uno de los elementos clave es el medio de cultivo que contiene siete grupos de elementos, considerados esenciales para la supervivencia celular, en los que se mantienen de forma muy estricta las concentraciones en rango con las encontradas en suero de adultos sanos. Estos siete grupos incluyen: 1) iones y osmolaridad; 2) hormonas; 3) oligoelementos; 4) antioxidantes y vitaminas; 5) nutrientes y metabolitos; 6) yodo, 7) etanol.

Gracias a esta forma de cultivo somos capaces de crecer durante al menos veinte pases *in vitro* células normales de tiroides que hasta ese momento nadie era capaz de crecer, utilizándose hasta ahora los sobrantes quirúrgicos simplemente en cultivos agudos. Nuestros cultivos estaban enriquecidos en >95% en células de epitelio folicular (Bravo et al, 2013). Al ser capaces de crecer epitelio folicular normal y canceroso en las mismas condiciones, podíamos comparar y buscar mecanismos específicos diferenciales, sin distorsiones derivadas de la proliferación “per se”, ya que en un tejido el epitelio canceroso se está dividiendo, pero el epitelio normal no. Esto se comprobó en nuestro estudio sobre el mecanismo de acción de TGF beta, uno de los factores más abundantes del epitelio normal y canceroso, que resetea su mecanismo de anti-proliferativo/pro-apoptótico en epitelio folicular normal a pro-proliferativo/anti-apoptótico en epitelio folicular de carcinoma diferenciado (Garcia-Rendueles et al, 2017).

Nuestro siguiente objetivo era buscar nuevas proteínas que explicasen mecanismos de cáncer de tiroides y sirvieran como diagnóstico, pronóstico o tratamiento. Así, comenzamos un estudio de proteómica diferencial. Se extrajeron proteínas de dos cultivos normales T-NT1 y T-NT2; y para incidir en la diferencia “cáncer”, decidimos incluir como “normal” un cultivo de bocio difuso por

Enfermedad de Pendred, T-PS2. El bocio es un crecimiento de epitelio folicular “normal” causado por alguna causa; en este caso, la mutación de Pendrin (SLC26A4) conlleva alteración de la síntesis de hormonas tiroideas, y la hipófisis estimula con más TSH un crecimiento compensatorio del epitelio folicular. El paciente es operado porque su glándula crece de forma no controlada.

Frente a ellos, se extrajeron proteínas de carcinomas papilares, T-PC2 y -PC3. T-PC2 se sacó en dos pases distintos y progresivos. En la Tabla IV.1 se describen las características claves de la pieza de origen de cada cultivo.

**Tabla IV.1. Características de los tejidos de origen de los cultivos utilizados en el estudio de 2D-proteómica.**

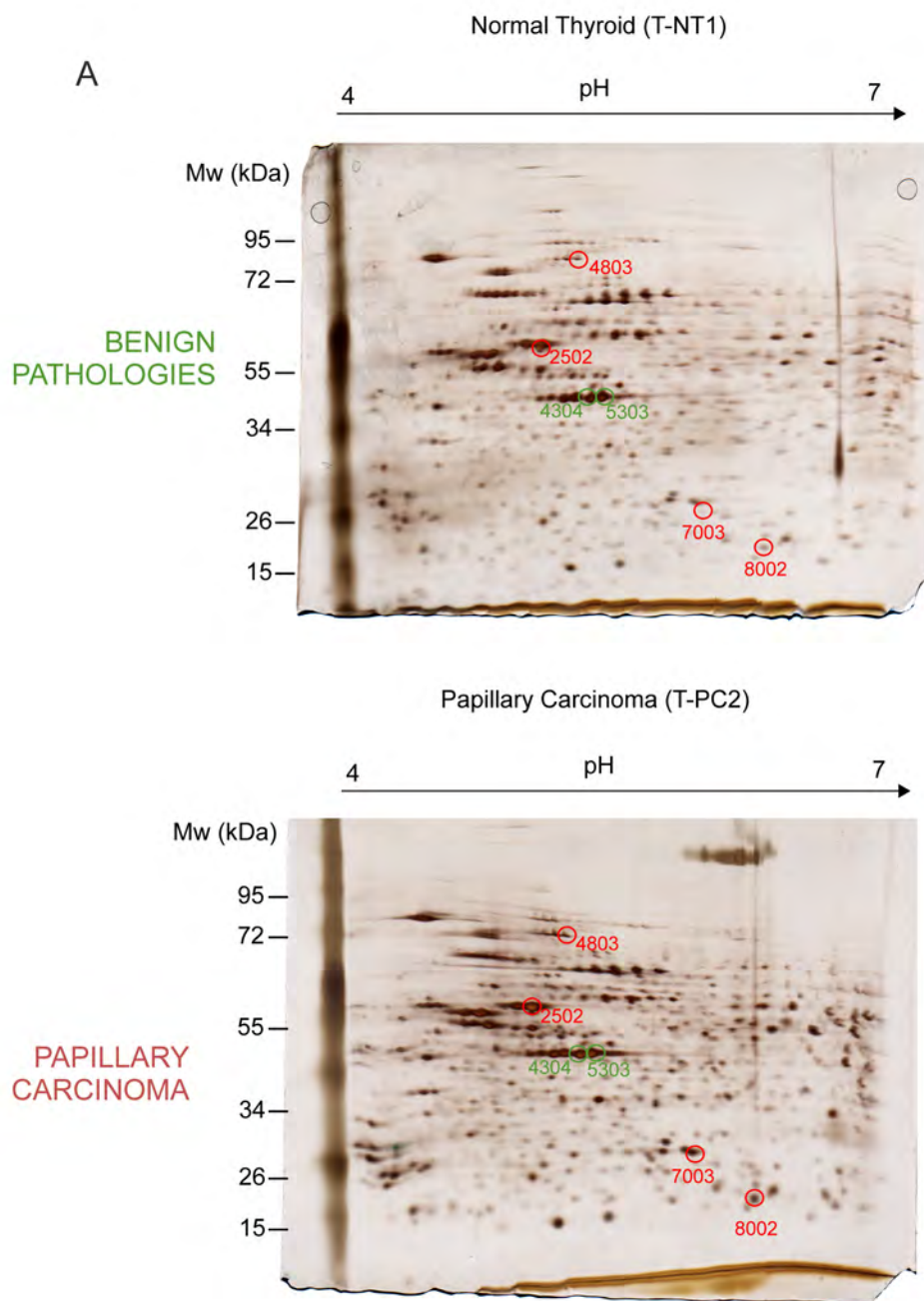
Normal/Benign	Characteristics	Differentiated Carcinoma	Characteristics
T-NT2	Normal thyroid, re-operation Woman, 24 years old Previous Contralateral Papillary Carcinoma, follicular variant minimally invasive	T-PC2	Papillary carcinoma, classic variant Man, 34 years old
T-NT3	Normal thyroid Woman, 44 years old Contralateral, Papillary Carcinoma, follicular variant	T-PC3	Papillary carcinoma. Tall cell variant Man, 73 years old
T-PS2	Nodule Pendred Sd. SLC26A mutation c.279delT, c.416-1G>A Man, 24 years old		

Se extrajeron las proteínas en los primeros pases de crecimiento en cultivo, mediante extracción con Urea/Thiourea/CHAPS. Se midieron las proteínas y se cargaron 50 microgramos en una tira de isoelectroenfoque de rango de pH: 4-7. Tras esta primera etapa, se corrió la tira en la segunda dimensión en un gel PAGE al 15%, y posteriormente se tiñó con tinción de plata. Las cuatro tiras de isoelectroenfoque y los cuatro geles se corrieron y se tiñeron juntos,

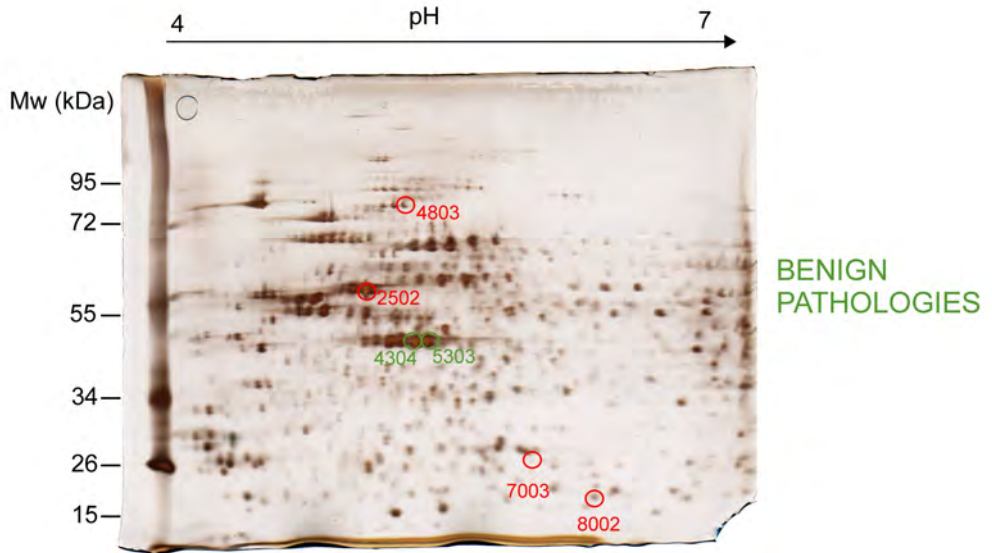
para evitar variables por cualquiera de estas etapas. (Figura IV.1-A). Los geles se escanearon y se analizaron con el programa PDQuest para un primer análisis (Figura IV.1-B), y se repitió el análisis con el programa SameSpots (Figura IV.1-C).

Se picaron spots correspondientes a dos grupos para su secuenciación. Un grupo de spots en los que no había diferencias significativas de intensidad. sin diferencias. El segundo grupo de spots correspondía a los spots que fueran diferencialmente más expresados en los carcinomas frente a los cultivos normales de forma cuantitativamente relevante, y estadísticamente significativa en ambos análisis. En conjunto se picaron 68 spots y se identificaron 44 proteínas.

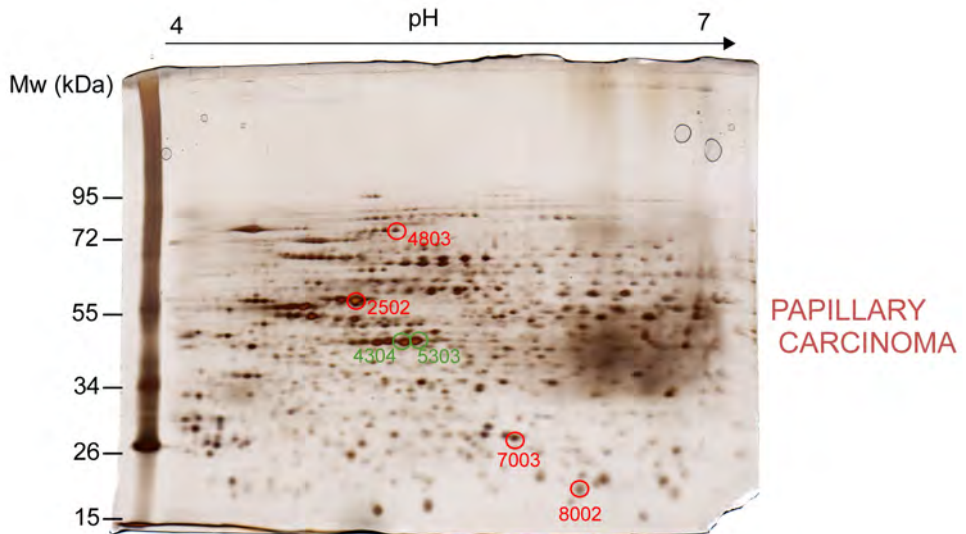
Como se puede observar en la figura IV.1-B los tres spots detectables que cumplen las características de expresión significativamente mayor en los geles de carcinomas de tiroides son: el spot 2502 y 4803, que aumentan 1,7 veces en cáncer, el spot 7003, exclusivo de cáncer, y el spot 8002 que se duplica en cáncer. Otro grupo de spots diferenciales spots 1203, 5403, 6406 y 7502 tenía una expresión significativa pero muy baja, incompatible con nuestra secuenciación. Repetido el análisis con otro programa, SameSpots, se confirmó el resultado de los spots diferenciales (se muestra para el spot 8002, Figura IV.1-C).

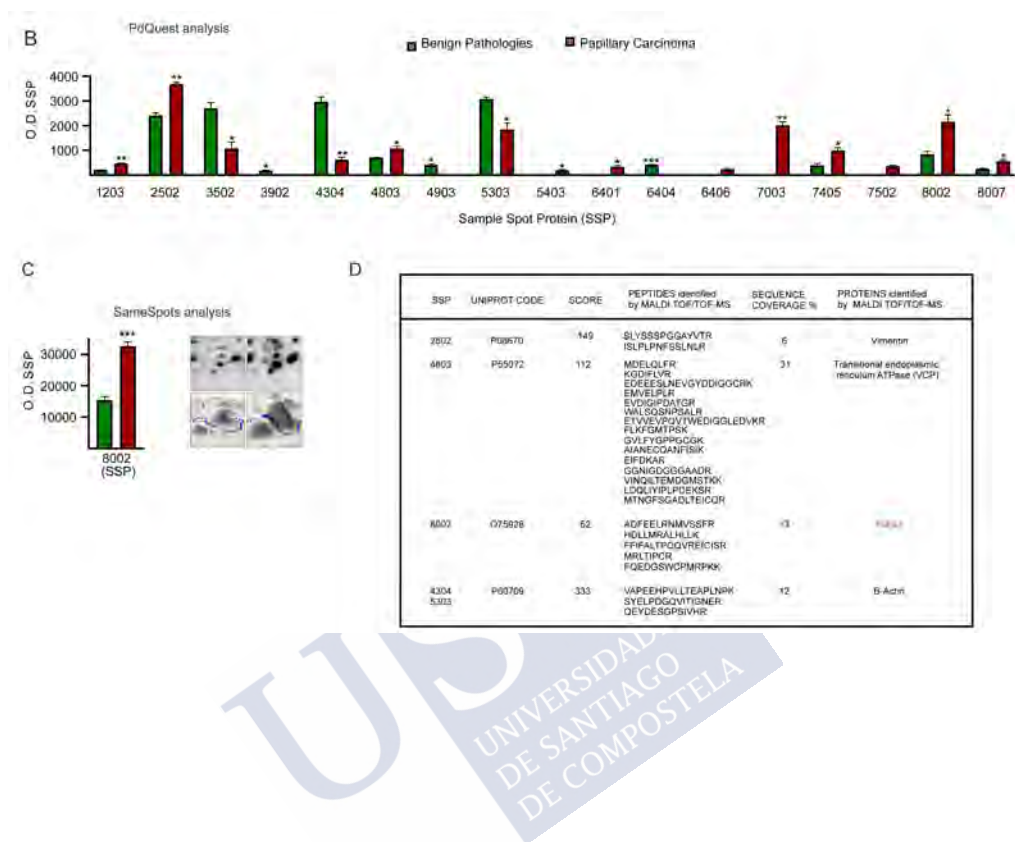


Pendred Syndrome (T-PS2)



Papillary Carcinoma (T-PC3)





**Figura IV.1. Estudio de expresión diferencial mediante 2D-proteómica entre cultivos de tejido normal/benigno y de carcinoma papilar de tiroides.** A) Se muestran dos geles de los cultivos “benignos” y dos geles de “carcinoma papilar” tras la segunda dimensión y la tinción de plata. B) Spots más diferentes tras el análisis con PDQuest. C) Se muestra la repetición del análisis con SameSpots. D) Identificación de cinco spots con expresión diferencial significativa en carcinomas papilares.  
(Media±SEM de un n=3. Mann-Whitney; \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001).



**Tabla IV.2. Proteínas no redundantes identificadas en el estudio de proteómica global que no mostraron diferencias cuantitativas entre cultivos benignos y cancerosos.**

Primary identification	Uniprot Entry / Recommended Protein Name	Gene
Mitochondrial ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting F1 complex beta subunit	P06576	ATP5F1B
Crystallin	P02489 Alpha-crystallin A chain	CRYAA
Catenin, alpha 1 isoform 15 Catenin, alpha 1 isoform 18 Catenin, alpha 1 isoform 19 Catenin, alpha 1 isoform 21	P35221	CTNNA1
Eukaryotic initiation factor 4A-I (ATP-dependent RNA helicase eif4a-1) (eif4a-l) (eif-4A-l)	P60842	EIF4A1
Tumor rejection antigen (gp96) 1	P14625 Endoplasmic	HSP90B1
78 kda glucose-regulated protein precursor (GRP 78) (Heat shock 70 kda protein 5) Bip protein	P11021 Endoplasmic reticulum chaperone BiP	HSPA5
Heat shock cognate 71 kda protein (Heat shock 70 kda protein 8) Heat shock 70kda protein 8 isoform 1	P11142 Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8
60 kda heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60) (60 kda chaperonin) (CPN60) (Heat shock)	P10809	HSPD1
Kiaa0303 Microtubule associated serine/threonine kinase family member 4 isoform a	Q15021 Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4	MAST4
Peroxiredoxin 2	P32119	PRDX2
Proteasome activator complex subunit 1 (Proteasome activator 28-alpha subunit) (PA28alpha) (PA28a)	Q06323	PSME1
Regulatory factor X, 5 isoform 1 isoform 1	P48382	RFX5
Synaptosomal-associated protein, 91kda homolog Clathrin coat assembly protein AP180	O60641	SNAP91
Mitochondrial transcription factor A	Q00059 Transcription factor A, mitochondrial	TFAM
Tubulin, beta	P07437	TUBB
Zinc finger protein 224, isoform CRA_a	Zinc finger protein 22	ZNF22

De los 44 spots identificados, 21 eran no redundantes. En la Tabla IV.2 se muestran 16 de las proteínas identificadas que no mostraron diferencias significativas en los estudios cuantitativos. Entre ellas están varias chaperonas bien citoplasmáticas (HSP90A1, HSPA8, CRYAA), bien mitocondrial (HSPD1) o de retículo endoplasmático (HSPA5). La identificación de dos proteínas mitocondriales

(ATP5F1B, TFAM) y de un factor iniciador de la traducción (EIF4A1) indicaría que son cultivos celulares activos. Se identificaron también proteínas del citoesqueleto (TUBB, CTNNA1), del proteasoma (PSME1), de endocitosis (SNAP91) y antioxidantes (PRDX2) relativamente abundantes en tiroides. Como proteínas nucleares se identificaron un factor de transcripción general (RFX5) y uno más característico de endodermo (ZNF22).

Los 5 spots identificados que mostraban diferencias cuantitativas significativas dieron como resultado 4 proteínas no redundantes (Figura IV.1-D). Los spots 4304 y 5303 correspondieron a la misma proteína del citoesqueleto, ACTB, y era la única identificada que estaba significativamente disminuida en cáncer (Fig IV.1-B y D). El spot 2502 era la vimentina, una proteína del citoesqueleto abundantemente expresada en tejido tiroideo (Uhlen et al, 2017; HPA, [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). El spot 4803 era la proteína VCP, una enzima ATPasa relacionada con segregación de membranas de organelos como retículo endoplásmico (Ye et al, 2005), mitocondria (Xu et al, 2011) o Golgi y endolisosomas (Ritz et al 2011), y que juega un papel en mitosis y en daño al DNA reclutando p53BP1 (Meerang et al, 2011; Acs et al, 2011).

El spot 8002 se identificó como la proteína PIAS2, una proteína desconocida hasta el momento en relación con la tiroides. Por esta razón la seguimos estudiando con más profundidad.

## ***IV.2 El gen PIAS2 y sus isoformas***

Realizamos un estudio *in silico* detallado de la proteína PIAS2 y su gen en humanos (Tabla IV.3). Están descritos 16 transcritos de mRNA en la base de datos Ensembl (<https://www.ensembl.org>; Zerbino et al, 2018) de los cuales sólo 8 tienen capacidad para ser traducidos y 8 no son codificantes. De los codificantes, 5 de esos transcritos sólo codifican péptidos pequeños de entre 80-282 aminoácidos cuya relevancia funcional es desconocida en este momento. Los 3 transcritos que dan proteína funcional son PIAS2-204 que origina la proteína PIAS2 beta (PIAS2b), PIAS2-201 que origina la proteína PIAS2 alfa

(PIAS2a) y PIAS2-2015 que origina una proteína pequeña llamada PIAS2 isoforma 8 o PIAS2 NY. Si vamos a la base datos NCBI (Sayers al, 2019; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) encontramos registrados 29 transcritos, 22 codificantes NM\_ y 7 no codificantes NR\_.

**Tabla IV.3. El gen de PIAS2 humano: sus isoformas de mRNA y proteína.**

[illegible]

PIAS2 no estaba estudiado en tiroides y nuestro resultado del análisis de proteómica indicaba que podía ser una proteína con expresión diferencial. Decidimos empezar su estudio detallado siguiendo nuestro objetivo inicial.

Para poder hacerlo necesitábamos diseñar unos ensayos de RT-PCR cuantitativa que permitiesen distinguir entre la expresión global de PIAS2, todas o una gran parte de las isoformas, y la expresión específica de isoformas que codificasen para las dos isoformas claves de la proteína, PIAS2a y PIAS2b. Diseñamos por tanto el ensayo, PIAS2 global (SybrGreen), dos ensayos para PIAS2b y dos ensayos para PIAS2a (para cada una de las dos técnicas TaqMan y SybrGreen, según necesitásemos más o menos sensibilidad) (Tabla III.18).

En las Tablas IV.4-5-6 se muestran nuestros diseños y las isoformas que reconocen bien del Ensembl (Zerbino et al, 2018; <https://www.ensembl.org>) bien del NCBI (Sayers et al, 2019; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Como se puede observar, es difícil hacer un único ensayo para todas las isoformas de mRNA de PIAS2 y en nuestro caso, íbamos encaminados a detectar sobre todo isoformas codificantes; así, nuestro ensayo global detecta 3 isoformas del Ensembl y 21 de las del NCBI, fundamentalmente codificantes, aunque faltarían algunas isoformas que codifican péptidos pequeños.

Los dos ensayos para PIAS2b (TaqMan y SybrGreen) detectan sólo isoformas codificantes de PIAS2b (1 en Ensembl, 10 en NCBI).

Los dos ensayos para PIAS2a (TaqMan y SybrGreen) detectan sólo isoformas codificantes de PIAS2a (1 en Ensembl, 6 en NCBI). Desafortunadamente, una de las isoformas codificantes de NCBI no se pudo detectar con nuestro ensayo (NM\_001324058).

Tabla IV.4. Ensayo PIAS2 global: isoformas que detecta marcadas en naranja.

Gene ENSEMBL ID	RNA Name ENSEMBL	Transcript ID ENSEMBL	bp ENSEMBL	Protein ENSEMBL	Biotype ENSEMBL	Gene NCBI ID	RNA Refseq NCBI	RNA Name NCBI	Protein Refseq NCBI	Protein Name NCBI
ENSG00000078043	PIAS2-204	ENST00000058916.5	11075	621aa	Protein coding	NM_001324046	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 4, mRNA		NP_001310975	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 4
						NM_001324047	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 5, mRNA		NP_001310976	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
						NM_001324048	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 6, mRNA		NP_001310977	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
						NM_001324049	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 7, mRNA		NP_001310978	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
						NM_001354034	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 19, mRNA		NP_001340963	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 10
						NM_001354035	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 20, mRNA		NP_001340964	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
						NM_001354036	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 21, mRNA		NP_001340965	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
						NM_001354038	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 27, mRNA		NP_001340967	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
						NM_001354039	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 28, mRNA		NP_001340968	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
						NM_004671	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant beta, mRNA		NP_004662	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform beta
	PIAS2-201	ENST00000324794.11	4543	572aa	Protein coding	NR_148700	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 24, non-coding RNA			
						NR_148701	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 25, non-coding RNA			
						NR_148703	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 29, non-coding RNA			
						NM_001324051	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 8, mRNA		NP_001310980	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
						NM_001324052	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 9, mRNA		NP_001310981	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
						NM_001324053	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 10, mRNA		NP_001310982	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
						NM_001324054	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 11, mRNA		NP_001310983	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
						NM_001324058	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 15, mRNA		NP_001310987	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 9
						NM_001354033	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 18, mRNA		NP_001340962	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
						NM_173206	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant alpha, mRNA		NP_775298	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform alpha
9063	PIAS2-215	ENST00000592212.5	2790	536aa	Protein coding	NR_148699	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 22, non-coding RNA			
						NM_001324055	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 12, mRNA		NP_001310984	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
						NM_001324057	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 13, mRNA		NP_001310986	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
						NM_001324059	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 14, mRNA		NP_001310988	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
						NM_001324060	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 3, mRNA		NP_001310989	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform NY
						NM_001354037	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 23		NP_001340966	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
						NR_136685	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 17, non-coding RNA			
	PIAS2-202	ENST00000398654.7	2043	182aa	Nonsense mediated decay	NR_136684	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 16, non-coding RNA			
						NR_148702	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 26, non-coding RNA			

Tabla IV.5. Ensayos PIAS2b (TaqMan y Sybr): isoformas que detectan marcadas en naranja.

Gene ENSEMBL ID	RNA Name ENSEMBL	Transcript ID ENSEMBL	bp ENSEMBL	Protein ENSEMBL	Biotype ENSEMBL	Gene NCBI ID	RNA Refseq NCBI	RNA Name NCBI	Protein Refseq NCBI	Protein Name NCBI
ENSG00000078043	PIAS2-204	ENST00000585916.5	11075	621aa	Protein coding	9063	NM_001324046	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 4, mRNA	NP_001310975	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 4
							NM_001324047	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 5, mRNA	NP_001310976	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
							NM_001324048	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 6, mRNA	NP_001310977	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
							NM_001324049	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 7, mRNA	NP_001310978	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
							NM_001354034	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 19, mRNA	NP_001340963	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 10
							NM_001354035	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 20, mRNA	NP_001340964	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
							NM_001354036	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 21, mRNA	NP_001340965	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
							NM_001354038	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 27, mRNA	NP_001340967	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
							NM_001354039	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 28, mRNA	NP_001340968	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
							NM_004671	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant beta, mRNA	NP_004662	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform beta
							NR_148700	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 24, non-coding RNA		
							NR_148701	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 25, non-coding RNA		
							NR_148703	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 29, non-coding RNA		
							NM_001324051	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 8, mRNA	NP_001310980	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
							NM_001324052	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 9, mRNA	NP_001310981	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
							NM_001324053	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 10, mRNA	NP_001310982	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
							NM_001324054	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 11, mRNA	NP_001310983	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
							NM_001324058	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 15, mRNA	NP_001310987	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 9
	NM_001354033	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 18, mRNA	NP_001340962	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7						
	NM_173206	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant alpha, mRNA	NP_775298	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform alpha						
	NR_148699	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 22, non-coding RNA								
	NM_001324055	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 12, mRNA	NP_001310984	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8						
	NM_001324057	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 13, mRNA	NP_001310986	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8						
	NM_001324059	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 14, mRNA	NP_001310988	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8						
	NM_001324060	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 3, mRNA	NP_001310989	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform NY						
	NM_001354037	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 23	NP_001340966	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8						
	NR_136685	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 17, non-coding RNA								

**Tabla IV.6. Ensayos PIAS2a (TaqMan y Sybr): isoformas que detectan marcadas en naranja.**

Gene ENSEMBL ID	RNA Name ENSEMBL	Transcript ID ENSEMBL	bp ENSEMBL	Protein ENSEMBL	Biotype ENSEMBL	Gene NCBI ID	RNA Refseq NCBI	RNA Name NCBI	Protein Refseq NCBI	Protein Name NCBI	
ENS00000078043	PIAS2-204	ENST00000589916.5	11075	621aa	Protein coding	9063	NM_001324046	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 4, mRNA	NP_001310975	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 4	
							NM_001324047	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 5, mRNA	NP_001310976	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5	
							NM_001324048	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 6, mRNA	NP_001310977	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6	
							NM_001324049	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 7, mRNA	NP_001310978	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6	
							NM_001354034	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 19, mRNA	NP_001340963	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 10	
							NM_001354035	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 20, mRNA	NP_001340964	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6	
							NM_001354036	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 21, mRNA	NP_001340965	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6	
							NM_001354038	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 27, mRNA	NP_001340967	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5	
							NM_001354039	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 28, mRNA	NP_001340968	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5	
							NM_0046671	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant beta, mRNA	NP_0046662	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform beta	
							NR_148700	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 24, non-coding RNA			
							NR_148701	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 25, non-coding RNA			
							NR_148703	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 29, non-coding RNA			
							NM_001324051	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 8, mRNA	NP_001310980	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7	
							NM_001324052	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 9, mRNA	NP_001310981	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7	
							NM_001324053	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 10, mRNA	NP_001310982	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7	
	NM_001324054	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 11, mRNA	NP_001310983	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7							
	NM_001324058	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 15, mRNA	NP_001310987	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 9							
	NM_001354033	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 18, mRNA	NP_001340962	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7							
	NM_173206	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant alpha, mRNA	NP_775298	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform alpha							
	NR_148699	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 22, non-coding RNA									
	NM_001324055	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 12, mRNA	NP_001310984	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7							
	NM_001324057	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 13, mRNA	NP_001310986	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8							
	NM_001324059	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 14, mRNA	NP_001310988	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8							
	NM_001324060	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 3, mRNA	NP_001310989	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform NY							
	NM_001354037	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 23	NP_001340966	SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8							
	NR_136685	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 17, non-coding RNA									

### IV.3 Validación del modelo de líneas celulares comerciales de cáncer de tiroides

Para empezar nuestro estudio funcional elegimos como primer modelo líneas celulares de carcinoma de tiroides de distintos orígenes tumorales y distinto contexto o “*background*” genético. Las líneas fueron validadas siguiendo las indicaciones del ICLAC (Capes-Davis et al, 2010; <https://iclac.org/>), pero con nuestro propio sistema empleado previamente basado en 16 STRs (Tabla IV.7). Como podemos observar todas las líneas eran distintas, y el patrón no ha variado desde el principio al final del estudio (datos no mostrados), por lo que sabemos que no se han contaminado durante los diferentes pases.

Tabla IV.7. Perfil de identificación genética con 16 STRs de las líneas celulares utilizadas en este estudio. Comparación con la base de datos ExPasy-Cellosaurus.

		FTC-283	ExPasy Cellosaurus DataBase			BCPAP	ExPasy Cellosaurus DataBase
Marcadores (Identifier Plus Panels v1)	D8S1179	10	10	Marcadores (Identifier Plus Panels v1)	D8S1179	12	12,13
	D21S11	32,2	32,2		D21S11	30,31,2	30,31,2
	D7S820	9,10	9,1		D7S820	10	10
	CSF1PO	10,11	10,11		CSF1PO	13,14	13
	D3S1358	16	16		D3S1358	16,17	16,17
	TH01	9,3	9,3		TH01	6,9,3	6,9,3
	D13S317	11	11		D13S317	12	12
	D16S539	11,12	11,12		D16S539	11,12	11,12
	D2S1338	20	20		D2S1338	18	18
	D19S433	13	13		D19S433	13,2	13,2,15
	vWA	15,18	15,18		vWA	14,17	14,17
	TPOX	8,9	9		TPOX	7,8,11	8,11
	D18S51	11,12	11,12		D18S51	17	13,17
	AMEL	X	X		AMEL	X	X
	D5S818	11,12	11,12		D5S818	10,11,12	10,11
	FGA	21	21		FGA	20,23	20,23



		8305C	ExPASy Cellosaurus DataBase			CAL-62	ExPASy Cellosaurus DataBase
Marcadores (Identifiler Plus Panels v1)	D8S1179	11,14	11,14	Marcadores (Identifiler Plus Panels v1)	D8S1179	13	13
	D21S11	30,32.2	30,32.2		D21S11	32.2	32.2
	D7S820	8,10	8 (DMSZ); 8,10 (ECACC)		D7S820	10	10
	CSF1PO	9,12	9,12		CSF1PO	9,12	9,12
	D3S1358	15	15		D3S1358	16	16
	TH01	6,7	6,7		TH01	7,9	7,9
	D13S317	9	9		D13S317	12	12
	D16S539	10,11	10,11		D16S539	12,13	12,13
	D2S1338	17,25	17,25		D2S1338	19,23	
	D19S433	14	14		D19S433	14	
	vWA	14,16	14,16		vWA	16	16
	TPOX	8	8		TPOX	8,9	8,9
	D18S51	13,24	13,24		D18S51	16	16
	AMEL	X	X		AMEL	X	X
	D5S818	10,13	10,13		D5S818	9,12	9,12
	FGA	21,22	21,22		FGA	19	19

		BHT-101	ExPASy Cellosaurus DataBase			MB-1	ExPASy Cellosaurus DataBase
Marcadores (Identifiler Plus Panels v1)	D8S1179	13,14,15,16	13,14,15	Marcadores (Identifiler Plus Panels v1)	D8S1179	13	
	D21S11	29,32.2	29,32.2		D21S11	31	
	D7S820	10,11	10,11		D7S820	9	9
	CSF1PO	12,13	12,13		CSF1PO	11	11
	D3S1358	16,17	16,17		D3S1358	14	
	TH01	9, 9.3	9,9.3		TH01	9	9
	D13S317	12	12		D13S317	11	11
	D16S539	9,11	9,11		D16S539	11	11
	D2S1338	20,23			D2S1338	20	
	D19S433	13,15			D19S433	15	
	vWA	19	19		vWA	14	14
	TPOX	8	8		TPOX	11	11
	D18S51	12,15	12,15		D18S51	19	
	AMEL	X	X		AMEL	X	X
	D5S818	10,11	10,11		D5S818	10	10
	FGA	18,24	18,24		FGA	23	

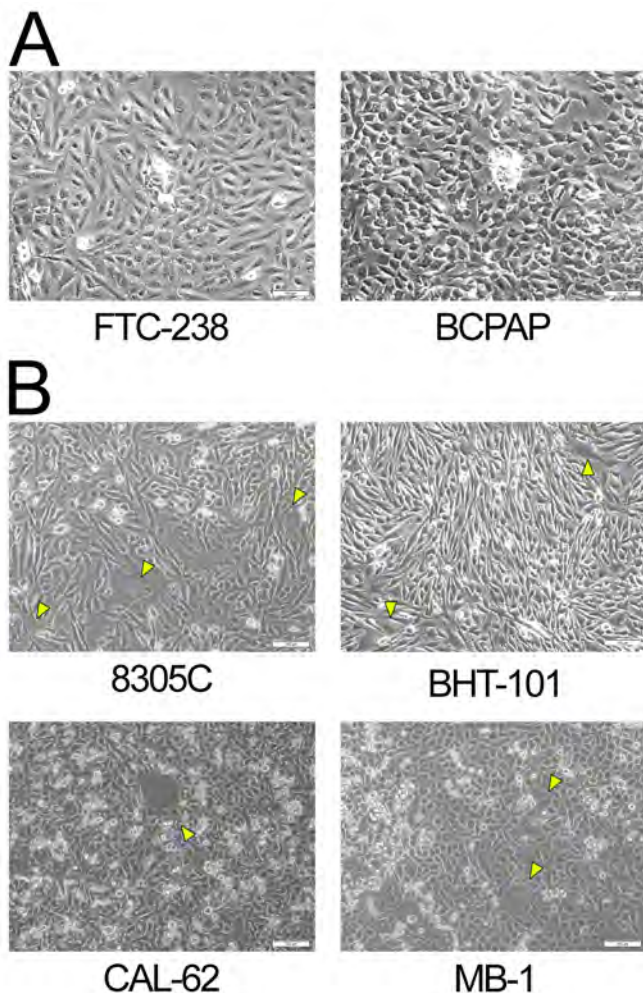
Las líneas fueron elegidas de forma que viniesen de pacientes y que no estuvieran modificadas genéticamente. Además, que representasen las categorías patológicas claves de carcinoma de tiroides. Así, las FTC-238 representan al carcinoma diferenciado folicular de tiroides (FTC) de un paciente hombre de 42 años, aunque vienen de una metástasis pulmonar que es característica de estos cánceres (Goretzki et al, 1989 & 1990). Las BCPAP vienen de un carcinoma pobremente diferenciado (PDTC) metastásico de una mujer de 76 años, pero que tenía un componente papilar (PTC) (Paulin et al, 1992). Por otra parte, las cuatro líneas de carcinoma anaplásico (ATC) fueron seleccionadas por representar distintos géneros y fondos genéticos: las 8305C provienen de una mujer japonesa de 85 años (Ito et al, 1994), las CAL-62 vienen de una mujer caucásica francesa de 70 años (Gioanni et al, 1991), las BHT-101 vienen de una mujer caucásica húngara de 63 años (Pályi et al, 1993), y las MB-1 vienen de un varón de 57 años caucásico de Suiza (Stenner et al, 2008).

En la Tabla IV.8 se recogen las mutaciones conocidas más características de estas líneas comerciales (Bairoch, 2018; Cellosaurus, <https://web.expasy.org/cellosaurus/>).

**Tabla IV.8. Líneas celulares comerciales utilizadas y sus características.**

Cell line	Genetic status	Patient	Pathology
FTC-238	TP53 R273H; TERT Promoter G228A Het	Man, 42 years old Caucasic, german	FTC, lung metastasis
BCPAP	BRAF V600E Hom; Homozigota para TP53 D259Y TERT Promoter G228A Het	Woman, 76 years old Caucasic, french	PDTC/ PTC
8305C	BRAF V600E Het; TP53 R273C; TERT Promoter G250A Het	Woman, 85 years old Asiática, japonesa	ATC
CAL-62	KRAS G12R; TP53 A161D; TERT Promoter wt	Woman, 70 years old Caucasic, french	ATC, right thyroid lobe
BHT-101	BRAF V600E Het; Homozigota para TP53 I251T TERT Promoter G228A Het	Woman 63 years old Caucasic, hungarian	ATC, lymph node metástasis (previous PTC)
MB-1	BRAFwt; RAS wt; TP53 A161D; TERT Promoter G228A Het	Man, 57 years old Caucasic, swiss	ATC, retrosternal mass

Las líneas fueron cultivadas con nuestro medio h7H aunque viniesen de otros tipos de medio, puesto que consideramos que por una parte es más apropiado para estudios funcionales ya que se parece más al medio interno humano, y por otra parte necesitábamos igualar las condiciones de crecimiento en líneas celulares comerciales con nuestros cultivos primarios.



**Figura IV.2. Líneas celulares comerciales. A)** Líneas de FTC (FTC-238) y de PDTC/PTC (BCPAP). **B)** Líneas de ATC. Flechas amarillas: células gigantes de carcinoma anaplásico.

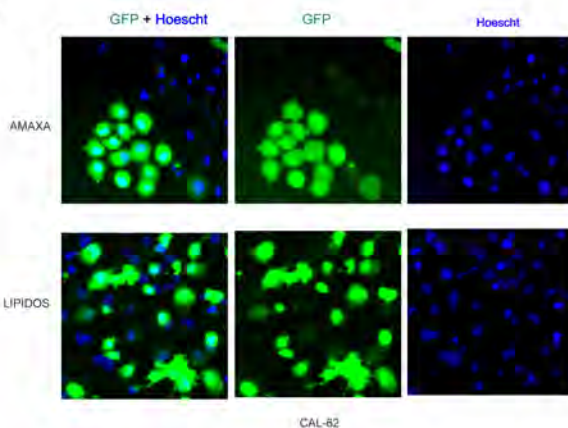
A

Línea celular	Solución	Eficiencia (%)
FTC-238	TURBOFECT	81
BCPAP	TURBOFECT	84
8305C	TURBOFECT	81
CAL-62	VIAFECT	85
BHT-101	TURBOFECT	60
MB-1	VIAFECT	55
Cultivo primario	Solución	Eficiencia (%)
T-NT2	TURBOFECT	67
T-NT36	TURBOFECT	55
T-NT39	TURBOFECT	74
T-NT47	TURBOFECT	85
T-NT52	TURBOFECT	73
T-NT66	TURBOFECT	67
T-GD9	TURBOFECT	43
T-MNG94	VIAFECT	68
T-MNG95	TURBOFECT	81
T-MNG96	TURBOFECT	77
T-MNG100	TURBOFECT	78
T-MNG170	TURBOFECT	76
T-MNG180	TURBOFECT	82
T-MNG182	TURBOFECT	84
T-PC35	TURBOFECT	70
T-PC46	TURBOFECT	76
T-PC48	TURBOFECT	80
T-PC64	TURBOFECT	69
T-PC65	TURBOFECT	74
T-M19	TURBOFECT	78
T-FC7	TURBOFECT	77
T-UC1	VIAFECT	70
T-UC2	VIAFECT	65
T-UC3	VIAFECT	73

B

Línea celular	Solución	Programa	Viabilidad (%)	Eficiencia (%)
FTC-238	KIT L	A-20	91	91
BCPAP	KIT L	A-20	100	80
8305C	KIT L	A-20	100	78
CAL-62	PBS	A-20	85	97
BHT-101	KIT L	A-20	75	81
MB-1	KIT primary mammalian epithelial cell	T-20	50	90

C



**Figura IV.3. Estandarización de una transfección eficiente en los distintos modelos celulares usados en este trabajo.** Se utilizó un plásmido preparado comercial que expresa GFP bajo el promotor fuerte CMV, el mismo en todos los casos. **A)** Métodos que emplean lípidos en líneas celulares (arriba) y cultivos primarios (abajo). **B)** Nucleofección con Amaxa junto con el buffer /kit necesario en la cubeta y el programa necesario. Se transfectaron un millón de células por cubeta. **C)** Se muestra los campos con GFP y la tinción con Hoescht que revela los núcleos de las células vivas (núcleos con tinción difusa) frente a los núcleos de las células moribundas (pequeños, muy brillantes y condensados), a partir de lo que se calculaba la eficiencia de transfección y la viabilidad.

Como se puede observar en la Figura IV.2, las líneas conservaban ciertas características esperables, como por ejemplo las células gigantes en las líneas de anaplásico, una característica observada en las muestras de tejido de los pacientes (Lloyd et al, 2017).

Nuestro grupo había demostrado la eficacia de la nucleofección con Amaxa para transfectar líneas celulares de tiroides humano (Bravo et al, 2010). Sin embargo, con los cultivos primarios –sobre todo células normales y benignas- no es habitual disponer de un millón de células por condición. Y por eso decidimos estandarizar la transfección con lípidos catiónicos que son más flexibles en cuanto a número de células ya que se hacen directamente en el pocillo. Evidentemente, al hacerlo para cultivos primarios también lo realizamos en paralelo para las líneas celulares. En la figura IV.3-A se muestran la eficiencia de transfección con los dos mejores métodos de transfección de las líneas de anaplásico que fueron estandarizados a partir de una batería de lípidos (datos no mostrados) para conseguir el máximo de eficiencia. Los lípidos testados fueron Eugene 6, Eugene 6HD, K2, Turbofect y Viafect. Sólo estos dos últimos permitieron alcanzar el grado de eficiencia necesario para nuestros propósitos. También se muestra el ajuste fino de la nucleofección con Amaxa (Figura IV.3-B). En la Figura IV.3-C se muestran campos representativos de la estandarización.

#### ***IV.4 Las proteínas PIAS2: caracterización y validación de dos anticuerpos.***

PIAS2b y PIAS2a son dos proteínas idénticas en los primeros 551 aminoácidos (Figura IV.4-A). Se reconocen varios dominios funcionales en esta secuencia (Uniprot, 2019; <https://www.uniprot.org/uniprot/O75928>):

- el dominio N-terminal SAP (aa.11-45) formado por dos conjuntos de residuos hidrofóbicos alternados con polares muy conservados separados por una glicina. Su acción sería de unión al DNA y organización de la cromatina. Incluye en su interior un subdominio LXXLL que se ha revelado importante para la interacción con otros factores de transcripción en otras proteínas (Liao et al, 2000).

- el dominio PINIT (aa. 331-408) formado por dos hojas beta anti-paralelas. Sirve como punto de anclaje del sustrato para promover la SUMOilación en lisina (Yunus et al, 2009).

- el SP-RING (aa. 331-408): dominio común a las proteínas Siz y PIAS, de ahí viene su nombre. Se diferencia de los clásicos “RING fingers” característicos de las E3 ubiquitina ligasas en que sólo contienen un ión  $Zn^{2+}$  en vez de dos. De esta forma funciona como E3 ligasa, pero de SUMO, no de ubiquitina. Por el SP-RING las proteínas PIAS se unen Ubc9 (UBE2I) que es una E2 SUMO-ligasa (Wu et al, 1997; Yunus et al, 2009).

- el sitio consenso de unión a SUMO (aa. 467-473)

- la secuencia de localización nuclear, NLS (aa. 484-492)

- A partir del aminoácido 551, la isoforma PIAS2a tiene una pequeña cola hasta su aa. 572 terminal. Pero, sin embargo, PIAS2b tiene otro dominio importante, el Dominio Carboxiterminal-Rico en Serina (Ser-rich Domain) aa. 571-612, en cuyo interior tiene un subdominio con una serie de siete serinas seguidas (Poly-S).

Como se desconocía qué anticuerpos estaban validados y para qué técnicas, durante este estudio se han probado hasta siete anticuerpos distintos (ver métodos). De ellos sólo hemos caracterizado dos, ya que los demás no parecían reconocer verdaderamente PIAS2 (Figura IV.4-B-H).

El epítipo del anticuerpo monoclonal de ratón anti-PIAS2 (mPIAS2) estaba localizado entre los aa. 518-540 y por tanto era común a PIAS2b y PIAS2a (Fig IV.4-A). El epítipo del anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-PIAS2 beta (rPIAS2) estaba localizado en la región rica en Serinas, exclusiva del extremo C-terminal de PIAS2b (Fig IV.5-A). rPIAS2 había sido validado para inmunohistoquímica por el consorcio Atlas (Uhlen et al, 2015; HPA, <https://www.proteinatlas.org>), pero no para otras técnicas.

Como controles utilizamos proteínas sobreexpresadas con un epítipo FLAG N-terminal humanas (Flag-hPIAS2b y Flag-hPIAS2a) (Arora et al, 2003). Ambos constructos fueron secuenciados íntegramente por nosotros, además de venir validados por secuenciación completa del banco de plásmidos Addgene. También tuvimos otro control sobreexpresando la proteína quimera EGFP-hPIAS2b (generosa donación de S.P. Jackson, Cambridge, UK, Galanty et al, 2009).

mPIAS reconocía de forma muy sensible las proteínas sobreexpresadas (Fig IV.4-B). Con transfecciones aparentemente iguales en cantidad de plásmido, Flag-hPIAS2a se expresaba de una forma diez-veinte veces más potente que Flag-hPIAS2b, y tuvimos que rebajar la cantidad de proteína para poder comparar las calles. Endógenamente nuestras células no parecían expresar PIAS2a detectable, pero sí PIAS2b que presentaba un peso alrededor de 75 kDa (p75PIAS2b) ligeramente superior a su peso teórico en las bases de datos de 68,5 kDa (Uniprot, 2019; <https://www.uniprot.org/uniprot>). Otras bandas superiores, p95PIAS2b y p140PIAS2b, aumentaban su intensidad en las calles transfectadas con proteína exógena, por lo que sacamos la conclusión de que eran PIAS2 modificadas post-traduccionalmente. Una banda más pequeña, p55, parecía una banda de procesamiento porque no correspondía ni con el peso teórico, ni consistentemente con el incremento de sobreexpresión.



En un gel hibridado para mPIAS2 donde se observaban claramente las proteínas exógenas transfectadas y la endógena (Fig IV.4-C izquierda), la rehibridación para rPIAS2 reconocía una única banda de mayor peso que mPIAS2, correspondiente a p95PIAS2b, pero no reconocía las proteínas exógenas sobreexpresadas (Fig IV.4-C derecha). Esto podría ser por que el *Tag* que se les había incorporado alterase la estructura, ya que ni reconocía a Flag-hPIAS2b ni a EGFP-hPIAS2b ambos con alteraciones N-terminales; sin embargo, el epítipo que reconoce rPIAS2b se localiza C-terminal. Cuando el gel era cargado con mayor cantidad en todas las calles y se hibridaba primero para rPIAS2 (Fig IV.4-D derecha), sí que aparecían sumada a p95PIAS2b, bandas menos intensas correspondientes a Flag-hPIAS2b y a EGFP-hPIAS2b además de detectar p75PIAS2b y p140PIAS2b, que luego fueron comprobados rehibridando para mPIAS2 (Fig IV.4-D izquierda).

mPIAS2 inmunoprecipitaba las proteínas PIAS2b exógenas y endógenas, incluyendo p75 y p95, y probablemente p140 (Fig IV.4-E). Si el inmunoprecipitado con mPIAS2 era cruzado haciendo western con rPIAS2 se detectaba fundamentalmente p95PIAS2b y menos intensamente p75PIAS2b, pero también p140PIAS2b; no se detectaban suficientemente las proteínas exógenas transfectadas (Fig IV.4-F). Si inmunoprecipitábamos con rPIAS2 cruzado con western anti-mPIAS2 volvíamos a detectar exclusivamente las tres proteínas endógenas p95, p75 y p140, y también p55PIAS2, pero no se detectaban las exógenas sobreexpresadas (Fig IV.4-G).

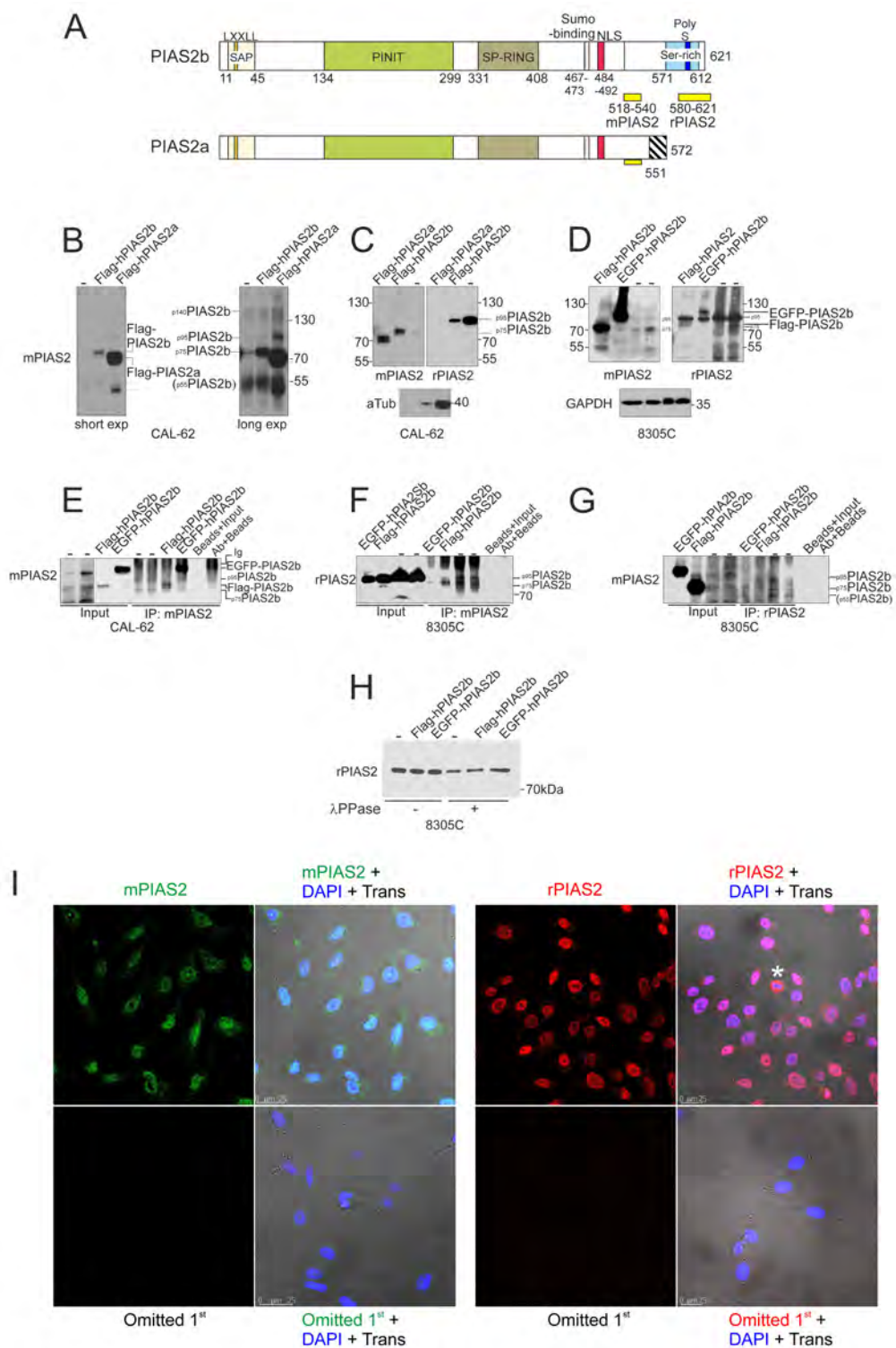
Desconcertados por esta diferencia, pensamos que podría ser probable que el reconocimiento de rPIAS2 por western necesitase que la proteína estuviese fosforilada en las serinas características de ese dominio C-terminal. Eso explicaría el peso más elevado y la falta de reconocimiento de las proteínas exógenas, que por alguna razón no se fosforilasen correctamente. Cuando tratamos extractos con fosfatasa (Fig IV.4-H) disminuyó la intensidad de la señal en el western anti rPIAS2 sugiriendo que podría ser posible esta posibilidad.

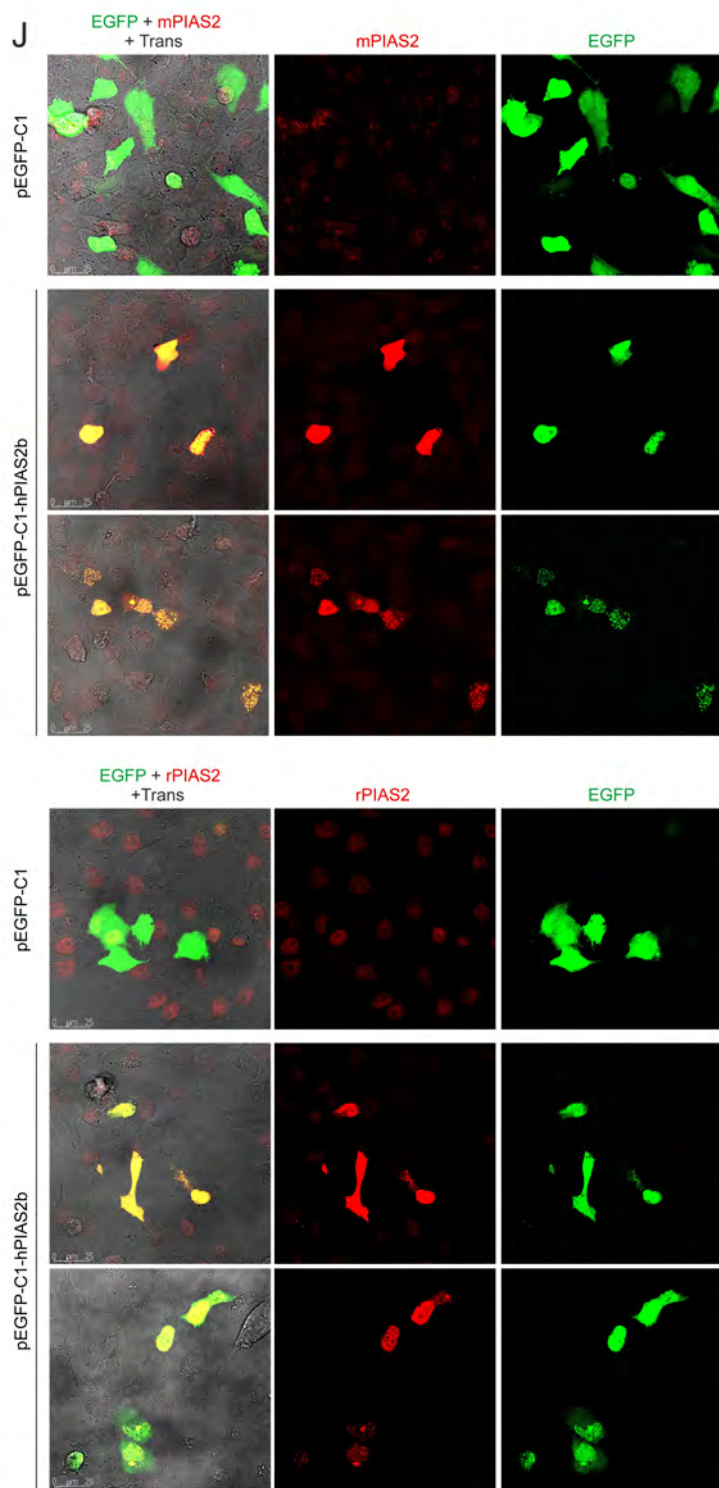
En inmunofluorescencia, mPIAS2 y rPIAS2 reconocían la proteína endógena nuclear, aunque rPIAS2 con más intensidad y



focalizada en el núcleo mientras mPIAS2 daba una señal nuclear menos intensa y localizada con alguna señal citoplasmática (Fig IV.4-I). Cuando se transfectó el vector pEGFP-C1 o pEGFP-C1-hPIAS2b ambos anticuerpos la reconocieron de forma muy intensa y colocalizando con EGFP en el núcleo (Fig IV.4-J).

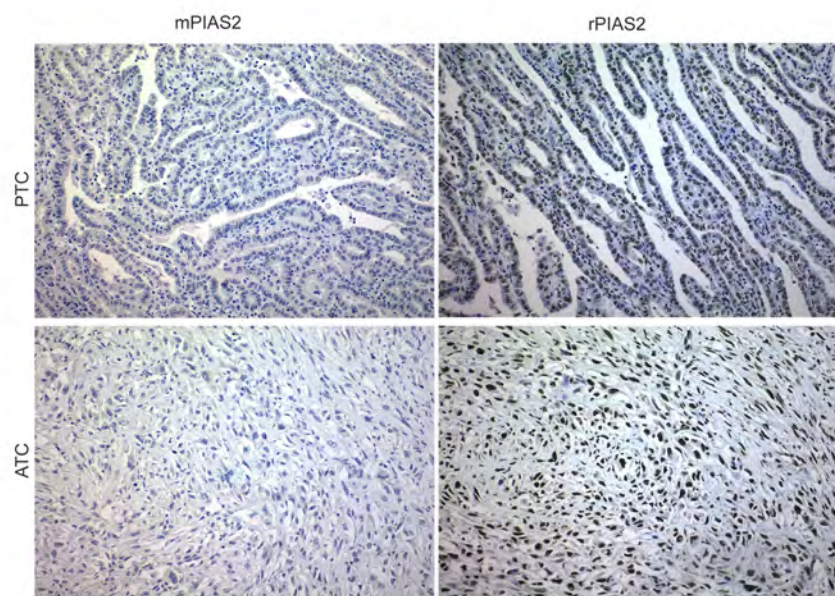
Finalmente, como se había caracterizado en el consorcio Atlas (Uhlen et al, 2015; HPA, <https://www.proteinatlas.org>), rPIAS2 teñía de forma limpia y específica por inmunohistoquímica (IHQ) los núcleos del epitelio folicular de cáncer de tiroides proveniente de secciones de bloques de parafina (FFPE) y procesado automático, pero mPIAS2 no daba ninguna señal en ninguna de las pruebas realizadas para con varias concentraciones y condiciones, ni en sistema automático ni en manual (Fig IV.4-K). Sólo cuando utilizamos secciones congeladas de criostato a partir de tejido no fijado inmerso en gel OCT, ligeramente post-fijadas con formalina, tuvimos señal con mPIAS2 (Fig IV.4-L). Esto indica que la desnaturalización del epítipo por la fijación prolongada y la inclusión en parafina es incompatible con la tinción con mPIAS2.





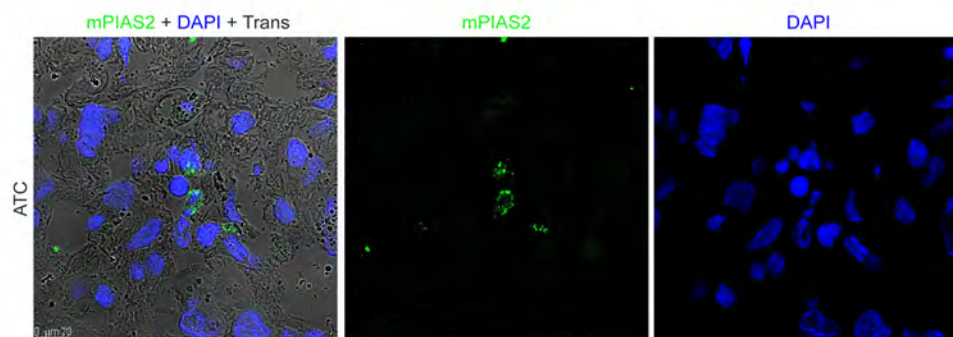
K

FFPE, IHQ



L

OCT, Cryosection



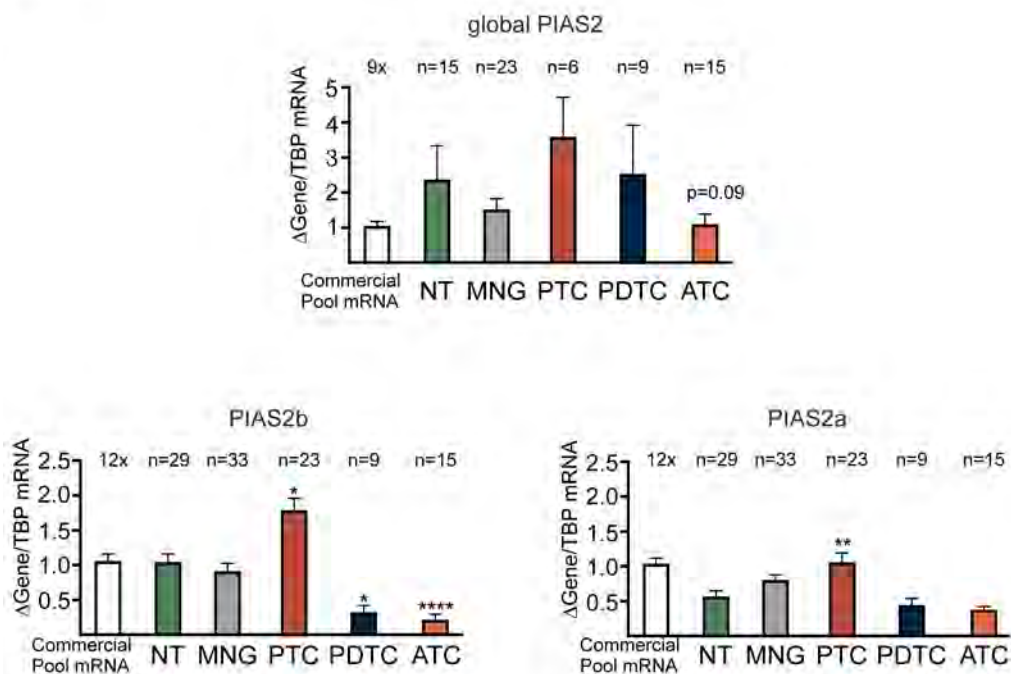
**Figura IV.4. La proteína PIAS2 y sus isoformas. Caracterización y validación de dos anticuerpos.**

**A)** Diagrama representativo de PIAS2 isoforma beta y alfa, que se diferencian en el extremo C-terminal. Dominios característicos en colores y los epítomos de los dos anticuerpos señalados en amarillo. **B)** *Western blot* con el anticuerpo mPIAS2 en extractos de células CAL-62 normales y transfectadas con dos constructos que sobreexpresan Flag-hPIAS2b y Flag-hPIAS2a. **C)** Westerns hibridado para mPIAS2 y rehibridado para rPIAS2. mPIAS2 reconoce las proteínas transfectadas y también la endógena, mientras que rPIAS2 reconoce una única banda endógena, y no reconoce las proteínas sobreexpresadas. **D)** Western con mucha concentración de proteína por calle hibridado contra rPIAS2 donde se observa que sí reconoce parcialmente las proteínas exógenas sobreexpresadas Flag-hPIAS2b y EGFP-hPIAS2b, además de las endógenas fundamentalmente p95PIAS2b y menos p75PIAS2b. El western se rehibridó para mPIAS2 dando un patrón opuesto, reconociendo las proteínas exógenas de forma muy sensible y sobre todo p75PIAS2b de las endógenas. **E)** mPIAS2 inmunoprecipita PIAS2 exógeno y endógeno. **F)** rPIAS2 inmunoprecipita PIAS2 endógeno bien, pero inmunoprecipita peor PIAS2 exógeno. **G)** Si se inmunoprecipita con mPIAS2, el western con rPIAS2 reconoce las dos proteínas endógenas, pero no las transfectadas. **H)** El epítipo rPIAS2 probablemente tenga que estar fosforilado, ya que si se tratan extractos con fosfatasa disminuye la intensidad en western. **I)** Arriba: Inmunofluorescencia con mPIAS2 o rPIAS2 para la proteína endógena (asterisco: célula en mitosis). Abajo: controles omitiendo el primer anticuerpo. **J)** Ambos anticuerpos, mPIAS2 y rPIAS2, reconocen la proteína EGFP-hPIAS2b transfectada, puesto que colocaliza con GFP en el núcleo (fusión de color amarillo). Como control se transfectó el plásmido pEGFP-C1. **K)** rPIAS2, pero no mPIAS2, funciona en inmunohistoquímica realizada a partir de tejidos de cáncer de tiroides parafinados. **L)** mPIAS2 tiñe criosecciones de tejido de cáncer anaplásico congelado fresco sin parafinar.



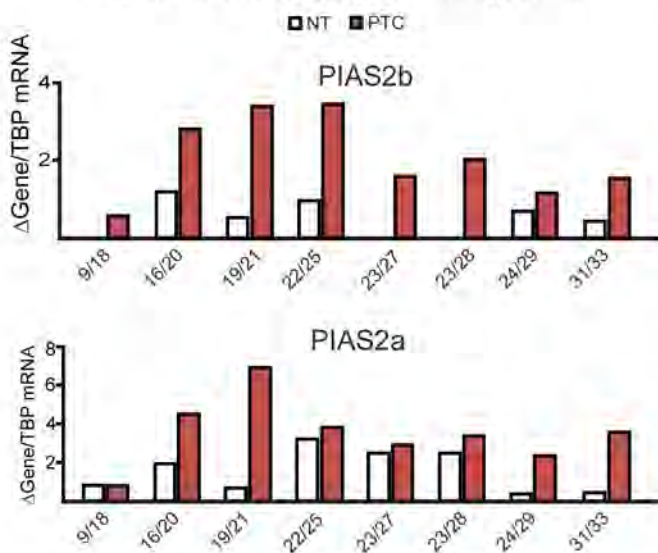
A

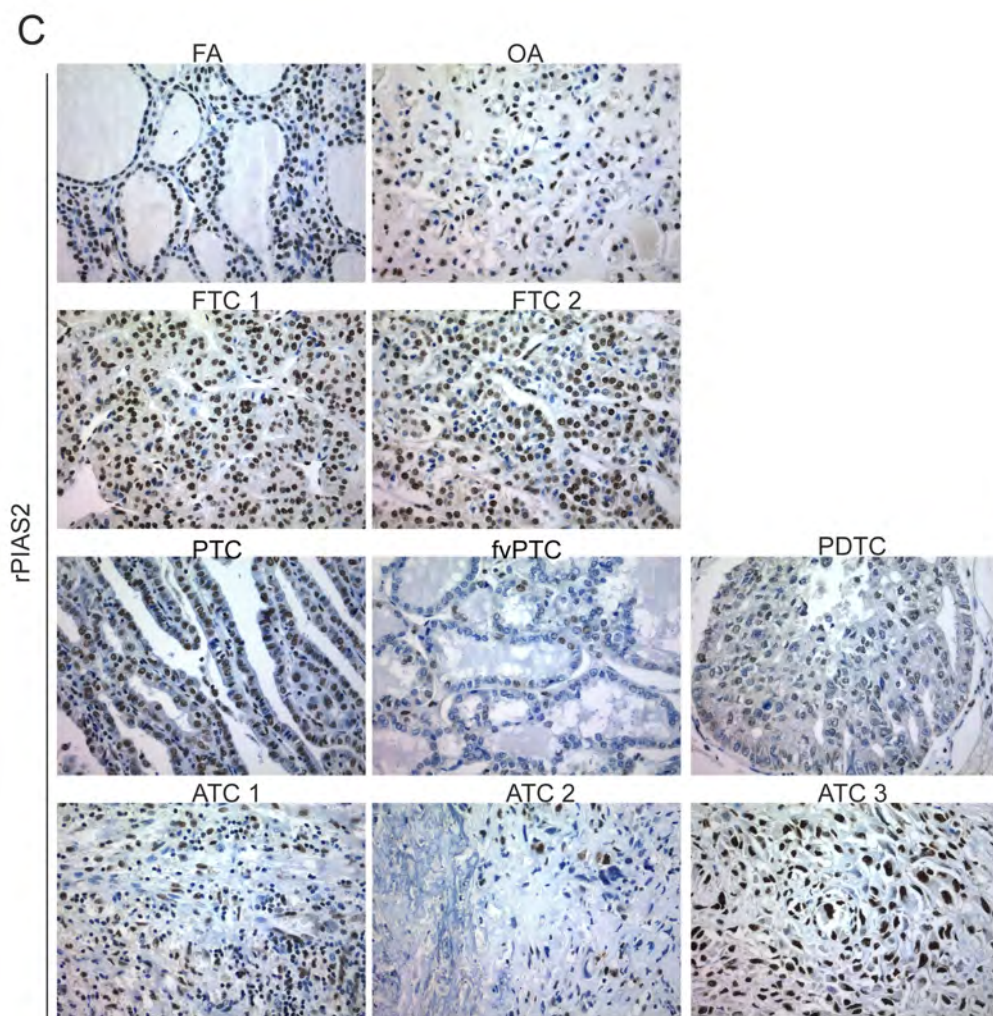
mRNA en tejidos de tiroides humano



B

mRNA en parejas de tejidos del mismo paciente





**Figura IV.5. Expresión de PIAS2b y PIAS2a en tejidos de tiroides humano normal, de proliferación benigna y cáncer.** A) Expresión de mRNA de PIAS2 global, PIAS2b y PIAS2a medida por PCR cuantitativa qRT-PCR TaqMan. B) Comparación de los niveles detectados por parejas de tejidos que proceden del mismo paciente, cáncer PTC frente a su tejido normal correspondiente. C) Inmunohistoquímica utilizando rPIAS2 en diversos tipos de tumores de tiroides humanos (Objetivo 40x). (FA, adenoma folicular; OA, adenoma oxifílico; PTC, carcinoma papilar; fvPTC, variante folicular de PTC; PDTC, carcinoma pobremente diferenciado; ATC, carcinoma anaplásico). (En cada grafica se encuentra el tamaño muestral de cada grupo. Kruskal-Wallis; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

#### ***IV.5 Expresión de PIAS2 en tejidos de tiroides de pacientes***

Una vez validados los anticuerpos, quisimos también poder cuantificar expresión de RNA en tejidos. Diseñamos unos ensayos TaqMan que nos permitiesen medir de forma cuantitativa la expresión de mRNA de las isoformas PIAS2b y PIAS2a. Nuestra serie de tejidos de la colección TIROCHUS (en colaboración para los casos de anaplásico con el grupo de la Dra. Laura Fugazzola, *Department of Endocrine and Metabolic Diseases Universidad degli Studi de Milano*) contaba con 29 tejidos normales (NT), 33 bocios multinodulares (enfermedad proliferativa benigna, MNG), 23 carcinomas diferenciados tipo papilar (PTC) de diversas variantes histológicas, 9 carcinomas pobremente diferenciados (PDTC) y 15 carcinomas anaplásicos o indiferenciados (ATC) (Figura IV.5-A). Como control técnico de las múltiples PCRs utilizamos una muestra comercial de mRNA de tejido normal de tiroides que se incluía en todos los platos de reacción (*Commercial Pool mRNA*).

Cuando se mide PIAS2 global que cuantifica muchas de las isoformas codificantes no se encontraron diferencias significativas, pero los ATC tenían menos que los demás tejidos ( $p=0,09$ ). Mientras los NT y MNG expresaban los mismos niveles de PIAS2b, los PTC expresaban de forma significativa más PIAS2b. Por otra parte, PDTC y ATC expresaban de forma significativa mucho menos PIAS2b (Figura IV.5-A izquierda-abajo).

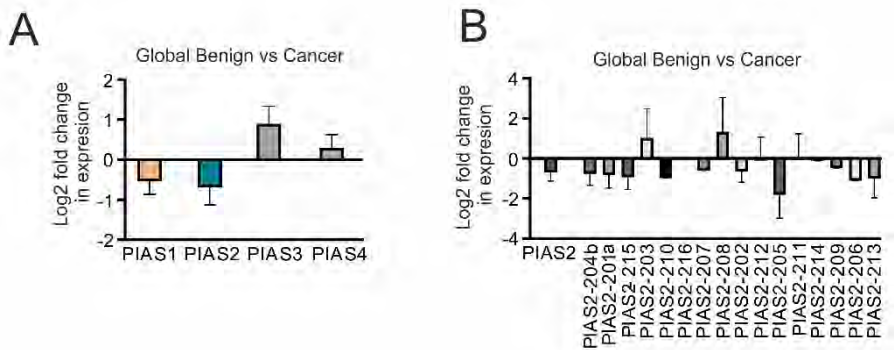
PIAS2a se expresaba en menor cantidad que PIAS2b en NT y PTC, y de nuevo se expresaba significativamente en mayor cantidad en PTC, pero no encontramos diferencias significativas en ningún otro grupo, incluyendo PDTC o ATC (Figura IV.5-A derecha abajo).

Cuando comparamos 8 parejas de tejido NT/PTC procedentes del mismo paciente encontramos que PIAS2b está incrementado en todos los casos, pero no era así con PIAS2a. (Fig IV.5-B).

La inmunohistoquímica con rPIAS2 nos confirmó la expresión nuclear exclusiva del epitelio folicular de las células normales, benignas o cancerosas (Fig IV.5-C). Los adenomas se teñían de forma homogénea. Los FTC y PTC variante clásica se teñían muy intensos y



uniformes. Algunos tipos de PTC como la variante folicular (fvPTC) estaban teñidos de forma irregular. También se observa menor intensidad en PDTC. Los ATC se veían teñidos en la fracción epitelial, y muy mezclados con otras poblaciones negativas. Sin embargo, nos pareció poco preciso realizar una cuantificación comparativa de esta tinción al no estar teñidas todas las células de la sección, ser diferentes tipos de cáncer y tener diferente proporción de tejido no epitelial.



**Figura IV.6. Expresión de PIAS2 global y de sus distintas isoformas tras RNAseq en un análisis comparativo “cáncer” frente a “benigno” de un paciente de carcinoma anaplásico de tiroides.** Las muestras obtenidas de cultivo y de tejido se secuenciaron y agruparon en dos apartados Cáncer frente a Benigno. **A)** Expresión de mRNA de los cuatro genes PIAS. PIAS1 y PIAS2 están disminuidos, aunque no de forma cuantitativamente muy marcada. **B)** Análisis de las distintas isoformas secuenciadas muestran que las tres isoformas que codifican proteínas PIAS2-204, 201 y 215 y las no codificantes 205 y otras están disminuidas, otras no varían, mientras que otras que codifican péptidos 203 y 208 aumentan ligeramente. (DEgenes algorithm).

Con motivo de otro proyecto (y otra tesis), en un caso de carcinoma anaplásico realizamos secuenciación masiva por RNAseq de cultivos+tejidos cáncer frente a cultivos+tejido de la porción benigna del mismo paciente (datos no mostrados). Como complemento a los datos de la presente tesis, en ese set de datos analizamos con detalle la expresión global de los genes PIAS y de todas las isoformas expresadas de PIAS2 [el resto de datos no se muestran puesto que corresponden a la tesis de MCM, en proceso] (Fig IV.6). Aunque PIAS2 no era de los genes que se alteraba ampliamente entre lesión benigna y cáncer, sí que observábamos una disminución en expresión global de PIAS1 y PIAS2. Cuando analizábamos las isoformas, vemos que en PIAS2 todas las isoformas codificantes de proteínas disminuyen, mientras que aumentan algunas que codifican pequeños péptidos.

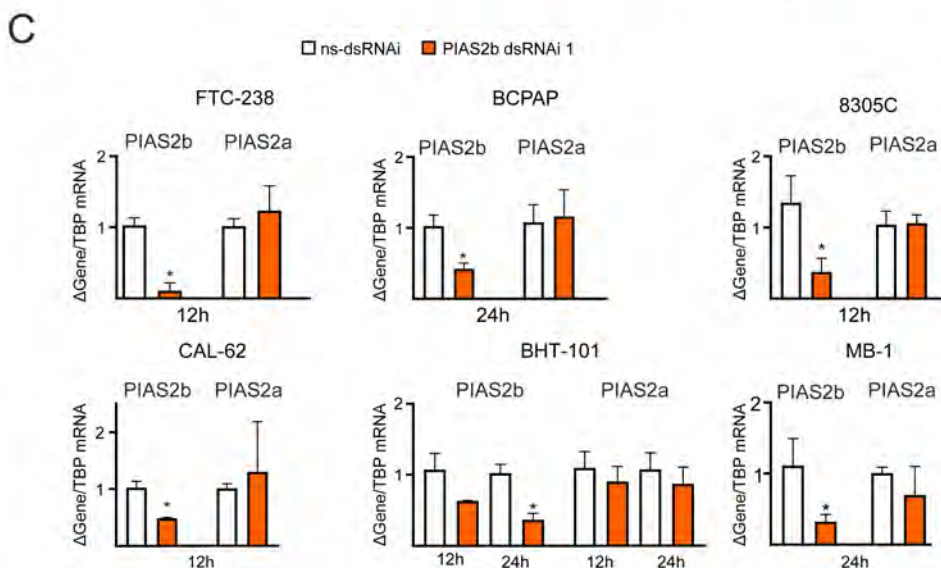
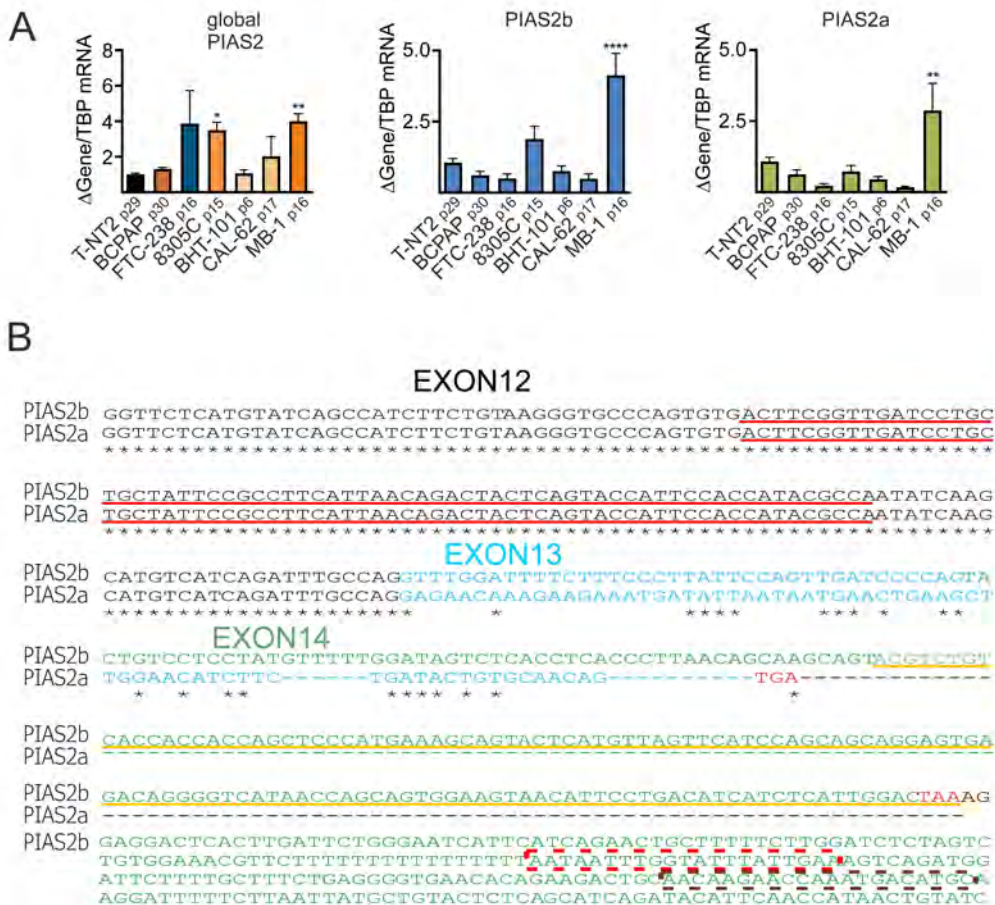
#### ***IV.6 Efecto de la represión de PIAS2b con dsRNAi en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de tiroides***

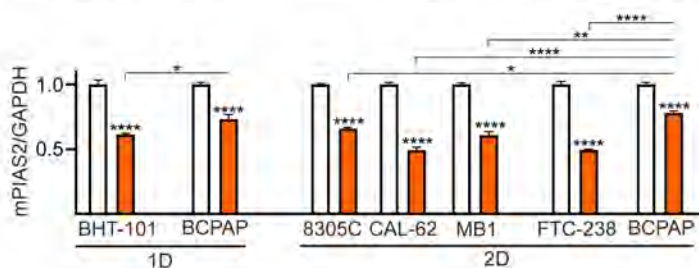
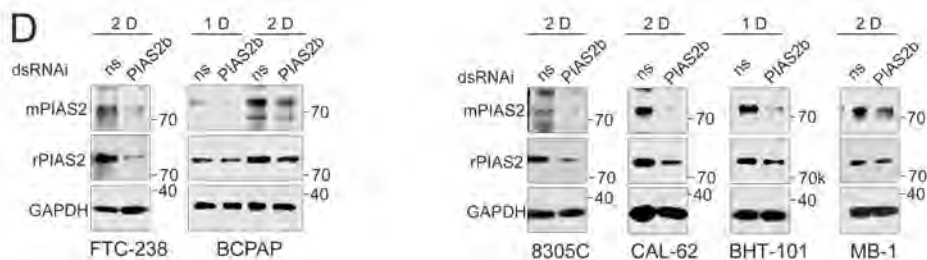
La proteína PIAS2 en tiroides no estaba estudiada. En PubMed sólo aparecía un artículo que estudiaba expresión global de mRNA de enzimas relacionadas con el proceso de ubiquitinización y SUMOilación, entre las que se incluían PIAS2, mediante qRT-PCR en tejido de sobrantes quirúrgicos de 77 PTCs comparando con su pareja de tejido control mediante qRT-PCR Sybr (Tuccilli et al, 2015). El estudio tiene relativa pobre calidad técnica ya que no garantiza la correcta selección de la zona cancerosa, ni se preocupa de tratar con DNAsa. En un 64,9% de los casos la expresión de PIAS2 disminuía, mientras que en un 18,1% aumentaba significativamente pero no se conseguía ninguna significación estadística con características del paciente, variables de pronóstico, de agresividad o mutación BRAF. Este estudio estaba en contradicción con nuestros datos (y se verá posteriormente que también con los datos de RNAseq del consorcio Atlas).

Decidimos entonces comenzar un estudio detallado de la función de PIAS2 en células de tiroides humano. Nos dispusimos

entonces a estudiar PIAS2 en nuestras líneas celulares comerciales de carcinoma de tiroides en comparación a un cultivo de origen tiroides normal T-NT2, que crece de forma indefinida (Bravo et al, 2013; Garcia-Rendueles et al, 2017). Primero medimos la expresión de RNA de PIAS2 en todas sus isoformas (global), y específicamente de las isoformas PIAS2a y PIAS2b por qRT-PCR cuantitativa TaqMan. Como se puede observar, la expresión global no siempre coincide con la de las isoformas individuales (Fig IV.7-A). Excepto en las MB-1 y 8305C que tienen abundancia de ambas isoformas PIAS2b y PIAS2a, las líneas de cáncer de tiroides expresan menos PIAS2b y PIAS2a que el cultivo celular normal T-NT2. En general, PIAS2a está menos expresado que PIAS2b, algo que coincide con los estudios caracterizando los anticuerpos mostrados en la Figura IV.4, donde no se detectó banda de PIAS2a en el peso esperado para PIAS2a ni en 8305C ni en CAL-62.

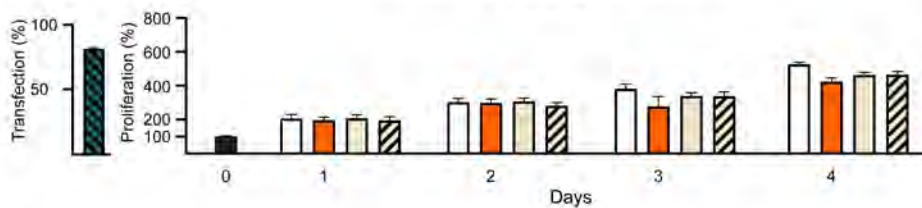
Para saber la función de una proteína, lo más directo es inhibir su expresión y observar si existe algún efecto en proliferación o fenotipo. Para inhibir la expresión se necesita interferencia con el mRNA (RNAi), pero en el caso de PIAS2 debe ser específico de isoforma, ya que nosotros ya sabíamos que interferiríamos con PIAS2b puesto que era la que detectábamos por western en estas células (Fig IV.4), y era la que veíamos diferencialmente expresada en los tejidos (Fig IV.5). Como todos los RNAi comerciales inhibían todas o muchas de las isoformas de PIAS2 decidimos diseñar nosotros RNAi basándonos en los datos esenciales requeridos para una secuencia de RNAi eficiente (Elbashir et al, 2001): 21 nucleótidos, que comience por AA (termine en UU en el RNAi, 3' UU *overhanging end*), no tenga un % GC excesivamente alto y no tenga más de tres nucleótidos iguales seguidos. Como la región diferente de PIAS2b es la final, nuestras secuencias se concentraron en la 3' UTR, localizadas en el exón 14 de PIAS2b (Fig IV.7-B).



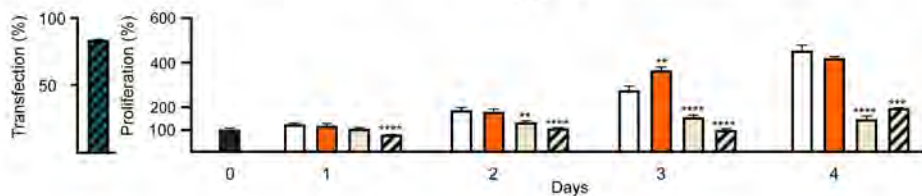


**E** ■ TRANSFECTION % □ ns-dsRNAi ■ PIAS2b dsRNAi 1 □ PIAS2b dsRNAi 2 ▨ PIAS2b dsRNAi 1+2

Metastatic Follicular Thyroid Carcinoma  
FTC-238



**F** Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma/ Papillary Thyroid Carcinoma  
BCPAP



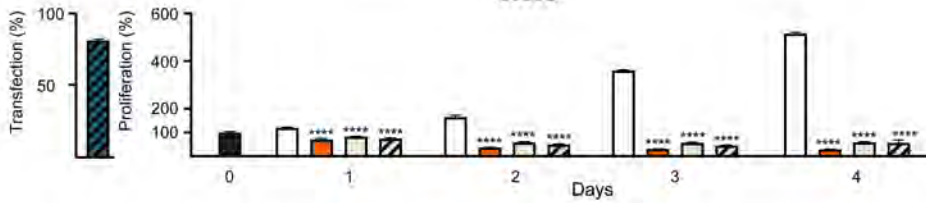


G

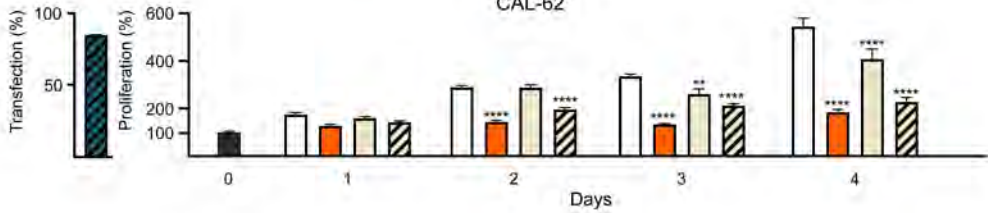
■ TRANSFECTION % □ ns-dsRNAi ■ PIAS2b dsRNAi 1 □ PIAS2b dsRNAi 2 ▨ PIAS2b dsRNAi 1+2

### Anaplastic Thyroid Carcinoma

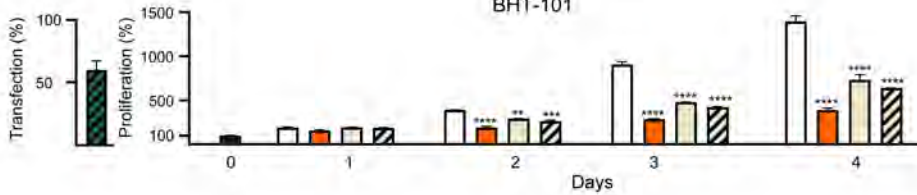
8305C



CAL-62



BHT-101



MB-1



**Figura IV.7. PIAS2b dsRNAi inhibe la proliferación de líneas de carcinoma anaplásico de tiroides.** A) Expresión del mRNA de PIAS2 global y de cada isoforma de proteína en las líneas de cáncer comparadas con un cultivo de células normales que crece indefinidamente (T-NT2). B) Secuencia entre los Exones 12 (negro), 13 (azul)-y 14 (verde) donde comienza la diferente secuencia entre PIAS2b y PIAS2a. Subrayado en rojo, epítipo de mPIAS2. Subrayado en naranja: epítipo de rPIAS2. TAA: codón de stop de traducción. Cajas: secuencias PIAS2b dsRNAi 1 (roja) y 2 (marrón). C-D) PIAS2 dsRNAi 1 reprime la expresión de mRNA medido por qRT-PCR (C) y de la proteína (D), específicamente de la isoforma beta, en todas las líneas celulares. Abajo: cuantificación los westerns de p70 PIAS2 con respecto al control de carga GAPDH. E-G) Efecto de PIAS2b dsRNAi 1, 2 o la suma de ambos en FTC-238 (E), BCPAP (F) o las cuatro líneas de carcinoma anaplásico (G). La eficiencia de transfección fue superior al 50% en todas las líneas.

(A: Media $\pm$ SEM de un n=3. Kruskal-Wallis; C: Media $\pm$ SEM de un n=3. Mann-Whitney; D: ANOVA; E-G: Media $\pm$ SEM de un n=3 con 3 replicados por condición en cada experimento. ANOVA de medidas repetidas. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001).



Tabla IV.9. Diseño y secuencias de dsRNAi para PIAS2 y de la secuencia control sin diana (off-target), y localización en el PIAS2b 3' UTR.

dsRNAi Name	siRNA Target Sequence	%GC	ANTISENSE siRNA Oligonucleotide Template (Bold: from T7 promoter)	SENSE siRNA Oligonucleotide Template	Sense strand siRNA 5'→3'	Antisense strand siRNA 5'→3'
PIAS2b dsRNAi 1	AATAATTTGGTATT ATTGAA	27,5 %	5'- AATAATTTGGTATT TATTGAAC <b>CCTGTC</b> -3'	5'- AATTCAATAAAT ACCAAATTA <b>CCTGTCTC</b> -3'	UAAUUUGGUA UUUUUAUGAAuu	UUCAAUAAAU ACCAAUUUAuu
PIAS2b dsRNAi 2	AACAAGAACCAAT GACATGC	44,8%	5'- AACAGAACCAAA TGACATGC <b>CCTGTCTC</b> -3'	5'- AAGCATGTCATT TGGTCTT <b>CCTGTCTC</b> -3'	CAAGAACCAA AUGACAUGCuu	GCAUGUCAUU UGUUCUUGuu
PIAS2b dsRNAi 3	AATTTGGTATTATT GAAAGT	31%	5'- AATTTGGTATTAT TGAAAGT <b>CCTGTC</b> -3'	5'- AAACTTTCAATA AATACCAA <b>CCTGTCTC</b> -3'	UUUGGUAUUU AUUGAAAGUuu	ACUUUCAUA AAUACCAAuu
PIAS2b dsRNAi 4	AACCATAACTGTATC TTCCTG	44,8%	5'- AACCATAACTGTA TCTTCCTG <b>CCTGTCTC</b> -3'	5'- AACAGGAAGAT ACAGTTATGG <b>CCTGTCTC</b> -3'	CCAUAACUGU AUCUCCUGuu	CAGGAAGAUACA GUUAUGGuu
PIAS2b dsRNAi 5	AATGGATGGAGTCT ACAAATC	44,8%	5'- AATGGATGGAGTC TACAAATC <b>CCTGTCTC</b> -3'	5'- AAGATTGTAGA CTCCATCCA <b>CCTGTCTC</b> -3'	UGGAUUGGAGU CUACAAUUCuu	GAUUUGUAGA CUCCAUCCuu
ns-dsRNAi-	AAGCGCGATAGCG GAATATA	55,6 %	5'- AAGCGCGATAGCG CGAATATA <b>CCTGTCTC</b> -3'	5'- AATATATTCGCG CTATCGCG <b>CC TGTCTC</b> -3'	GCGCGAUAGC GCGAAUAUuu	UAUAUUCGCG CUAUCGCGuu
<p><b>PIAS2b UTR:</b></p> <p>TCAGATTGGCAG<b>G</b>TTTGGATTTTCTTTCCCTATTCCAGTTGATCCCCAG<b>T</b>ACTGTCTCTCTATGTTTTTGATA GTCTCACCTCACCTTAACAGCAAGCAGTACGTCTGTCAACCACCACAGCTCCCATGAAAGCAGTACTCATGTTA GTTCATCCAGCAGCAGGAGTGAGACAGGGGTCAACCAGCAGTGGAAAGTAACATTCTGACATCATCTCATTG GACTAAAGGAGGACTCACTTGATTCTGGGAATCATTCATCAGAACTGCTTTTTCTTGGATCTCTAGTCTGTGGAA ACGTCTTTTTTTTTTTTTTT<b>AAAT</b>TAATTTGGTATTATGAAGT<b>C</b>CAGATGGATTCTTTTGCTTTCTGAGGGGTG AACACAGAAGACTGC<b>ACAAGA</b>ACCAATG<b>ACATG</b>CAAGGATTTTTCTTAATTATGCTGTACTCTCAGCATCAG ATACATTCAACCATAACTGTATCTTCTGAGAGATGGATTTCACITTCATACGTT<b>AAATGGATGGAGCTACAAAT</b> <b>C</b>AGTGAAAAAAGTTTTGTTAAATAAAGAGCAATAAAATTA</p> <p>Cian: nucleótido donde empieza el Exón 13 diferencial específico de PIAS2b. Amarillo: nucleótido donde empieza el Exón 14 específico de PIAS2b. Rosa: Codón de stop de traducción; Rojo: PIAS2b dsRNAi 1; Verde: PIAS2b dsRNAi 2; Azul: PIAS2b dsRNAi 3; Gris: PIAS2b dsRNAi 4; Morado: PIAS2b dsRNAi 5.</p>						



Para hacer el diseño utilizamos el siRNA Template Tool de Ambion,  
[http://www.ambion.com/techlib/misc/silencer\\_siRNA\\_template.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/silencer_siRNA_template.html).  
Y para sintetizar el dsRNAi utilizamos su kit de transcripción *in vitro* basándonos en la T7 polimerasa. La aplicación web nos encontró cinco secuencias con nuestras condiciones (Tabla IV.9).

Las secuencias de 19 nucleótidos fueron blasteadas para comprobar que su único transcrito reconocido con un Total score >31 y un E-value <1 fuese PIAS2b (datos no mostrados). Estos criterios los basamos en las recomendaciones que indicaban no aceptar ninguna secuencia que reconociese una región idéntica de 16 nucleótidos (Ambion, Silencer® siRNA construction kit manual; Elbashir et al, 2001). Como podemos observar en la Tabla IV.10 las secuencias reconocen sólo PIAS2-204 (PIAS2b) y PIAS-202, una de las isoformas no codificantes (se muestran sólo para las usadas en el estudio). Ningún otro mRNA humano superó nuestros criterios en ninguna de las 5 secuencias. La secuencia control ns-dsRNAi no superó en ningún target con Total score >24 y E-value <111.

**Tabla IV.10. PIAS2b dsRNAi: isoformas de PIAS2 reconocidas.** Tanto la secuencia 1 como la 2 reconocen PIAS2-204 (PIAS2b) y PIAS2-202, una isoforma no codificante.

ds-RNAi name	Gene ID ENSEMBL	RNA Name ENSEMBL	Transcript ID ENSEMBL	RNA Refseq NCBI	Gene ID NCBI	RNA Name NCBI	Protein Refseq NCBI	Protein Name NCBI
PIAS2 ds-RNAi 1 and PIAS2 ds-RNAi 2	ENSG00000078043	PIAS2-204	ENST00000585916.5	NM_001324046	9063	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 4, mRNA	NP_001310975	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 4
				NM_001324047		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 5, mRNA	NP_001310976	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
				NM_001324048		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 6, mRNA	NP_001310977	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
				NM_001324049		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 7, mRNA	NP_001310978	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
				NM_001354034		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 19, mRNA	NP_001340963	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 10
				NM_001354035		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 20, mRNA	NP_001340964	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
				NM_001354036		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 21, mRNA	NP_001340965	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
				NM_001354038		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 27, mRNA	NP_001340967	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
				NM_001354039		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 28, mRNA	NP_001340968	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
				NM_004671		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant beta, mRNA	NP_004662	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform beta
				NR_148700		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 24, non-coding RNA		
				NR_148701		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 25, non-coding RNA		
				NR_148703		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 29, non-coding RNA		
		PIAS2-202	ENST00000398654.7	NR_136684		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 16, non-coding RNA		
				NR_148702		Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 26, non-coding RNA		

Seleccionamos de forma empírica para transfectar en las células las dos primeras secuencias PIAS2b dsRNAi 1 y 2 razonando que, la secuencia 1 se superponía parcialmente en la misma secuencia con la 3, por lo que descartamos esta última, y que, las secuencias 4 y 5 estaban mucho más terminales y pudiera haber alguna estructura secundaria de la cadena de mRNA a este nivel que impidiera su unión (Fig IV.7-B).

Cuando intentamos medir si la transfección de la secuencia PIAS2b dsRNAi 1 comparada con la secuencia control ns-dsRNAi reprimía la expresión de PIAS2b o PIAS2a por TaqMan, el número de valores indetectables en las muestras PIAS2b dsRNAi 1 fue tan numeroso que impedía hacer estadística (datos no mostrados). Utilizamos entonces un sistema de qRT-PCR cuantitativa basado en SybrGreen que es menos específico, pero más sensible (Fig IV.7-C). PIAS2b dsRNAi 1 reducía de forma eficiente, significativa y específica la expresión del mRNA de PIAS2b, pero no de PIAS2a en las cinco líneas celulares (Fig IV.7-C). PIAS2b dsRNAi 1 reducía de forma eficiente la proteína PIAS2 la expresión de la proteína medida por *western blot*, tanto con mPIAS2 como con rPIAS2 (Fig IV.7-D). Al cuantificar los westerns blot se observó que en todas las líneas celulares se reprimía p75 mPIAS2 tras el tratamiento con PIAS2 dsRNAi 1, pero en la línea BCPAP la represión era significativamente menor que en las demás líneas tanto a uno como a dos días tras la adición del dsRNAi (Fig IV.7-D diagrama de barras).

La eficacia de transfección fue superior al 75% en FTC-238, BCPAP, 8305C y CAL-62, y mayor al 50% en BHT-101 y MB-1 (Fig IV.7-E).

Sin embargo, el efecto funcional que tuvieron nuestros dsRNAi en el crecimiento celular fue diverso dependiendo de la secuencia y del origen de las líneas:

- En la línea de carcinoma diferenciado folicular FTC-238 ninguna secuencia tuvo efecto (Fig IV.7-E).
- En la línea de carcinoma pobremente diferenciado BCPAP la secuencia 1 no tuvo efecto, pero la secuencia 2 o la suma de 1+2 tuvieron un significativo efecto antiproliferativo (Fig IV.7-E).
- En las cuatro líneas de carcinoma anaplásico -8305C, CAL-62, BHT-101 y MB-1- las dos secuencias tuvieron un marcado efecto antiproliferativo (Fig IV.7-E).

Aunque había pocas diferencias en el marcado efecto antiproliferativo entre los tres tratamientos en las líneas de anaplásico, la secuencia que tuvo el efecto más potente, duradero y consistente en las cuatro líneas anaplásica fue PIAS2b dsRNAi 1, por lo que continuamos caracterizando su efecto en cultivos primarios de nuestra colección TIROCHUS con este protocolo.

Pero antes, para asegurarnos que el método de transfección (lípidos) no interfería en la eficacia de los dsRNAi y como teníamos bien estandarizada la transfección por nucleofección Amaxa de nuestras líneas celulares, realizamos transfecciones de PIAS2b dsRNAi 1 (a la mínima concentración recomendada, 40 picomoles) y de PIAS2b dsRNAi 2 en un rango de concentraciones desde 40 hasta 160 picomoles en comparación con ns-dsRNAi (datos no mostrados). La eficiencia de transfección fue superior al 70%, y todas las cubetas se ajustaron a la misma cantidad de dsRNAi total por cubeta (160 picomoles). Coincidiendo con los resultados de la Figura IV.7, ningún PIAS2b dsRNAi fue eficaz en la línea FTC-238. Tampoco en la línea BCPAP. Sin embargo, en las cuatro líneas anaplásicas PIAS2b dsRNAi 1 tuvo un efecto antiproliferativo significativo, mientras que el 2 no tuvo efecto consistente. Esto nos convenció de seguir explorando la secuencia 1.

Los cultivos primarios son mantenidos en condiciones humanizadas (medio h7H) y estandarizados de la misma forma que las

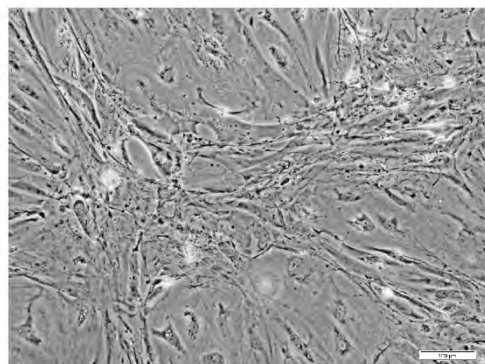
líneas celulares. Además, cuando disponemos de él, crecemos en paralelo tejido normal o benigno y tejido canceroso procedentes del mismo paciente. En la Fig IV.8 podemos observar unos ejemplos provenientes de casos de carcinoma anaplásico y sus correspondientes tejidos benignos.

En la Tabla IV.11 podemos observar el perfil genético de algunos cultivos comparando el cultivo normal con el canceroso, y a su vez con su tejido original de donde fueron crecidos. Vemos que la conservación del perfil genético es absoluta, aunque en los cánceres anaplásicos tenemos pequeñas variaciones esperadas por cierta heterogeneidad tumoral en un cáncer tan agresivo. Sin embargo, debemos indicar que los estudios de secuenciación masiva en cáncer de tiroides han encontrado que la carga de mutaciones por tumor (*mutational burden*) no es demasiado intensa y es una de las más bajas de todos los cánceres humanos (Williams et al, 2016; Martincorena et al, 2018). Aunque es probable que los datos se refieran a carcinoma diferenciado y pobremente diferenciado, y no tanto a anaplásico. En un estudio donde se comparan la carga global de mutaciones en cánceres de muchos órganos, el carcinoma de tiroides estaba entre los más bajos con alrededor de 1,5 mutaciones/ $10^7$  bases/división frente al carcinoma de pulmón por ejemplo con casi 1 mutación/ $10^6$  bases/división (Williams et al, 2016). En otro estudio posterior donde estudiaban exclusivamente las sustituciones se encontró que el cáncer de tiroides tiene <1 sustitución/tumor en oncogenes “driver” frente a por ejemplo el cáncer de colon o endometrio con 4 sustituciones/tumor en oncogenes “driver”, y, centrándose en la región codificante exclusivamente, el cáncer de tiroides tenía <1 sustitución codificante/tumor en oncogenes “driver” frente a >10 sustituciones codificantes/tumor en oncogenes “driver” en carcinoma de colon, endometrio o melanoma (Martincorena et al, 2018).

Tabla IV.11. Perfil genético de algunos cultivos (T-) comparados con sus tejidos de origen (TH-). Azul o verde, cultivos de un mismo paciente. (NT, Tiroides normal; MNG, bocio multinodular; FC, carcinoma diferenciado folicular; UC, carcinoma anaplásico).

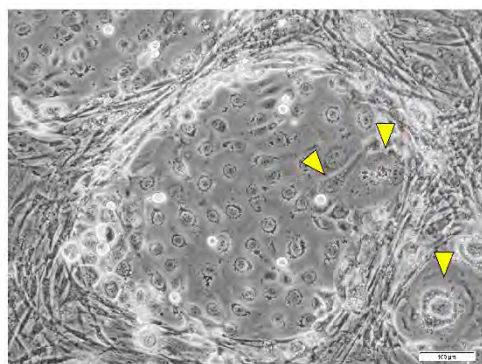
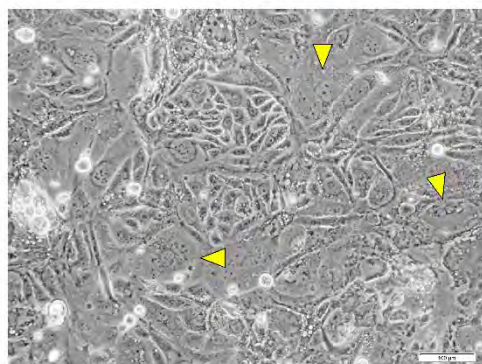
		T-NT2 (p5)	TH-FC7 — T-FC7 (p14)	TH-MNG94 — T-MNG94 (p3)	TH-UC1 — T-UC1 (p4)	TH-UC2 — T-UC2 (p4)	TH-MNG170 — T-MNG170 (p4)	TH-MNG178 — T-MNG178 (p4)	TH-MNG179 — T-MNG179 (p4)	TH-UC3 — T-UC3 (p7)
Marcadores (Identifiler Plus Panels v1)	D8S1179	12,14	13,14	13,14	13,14	13,14	14	10,11	10,11	10,11
	D21S11	29,32.2	30,31	28	28	28	27,28	29,32.2	29,32.2	<del>29</del> ,32.2
	D7S820	11,12	10,12	9	9	9	9,10	11,12	11,12	11,12
	CSF1PO	11,12	10,11	10,14	10,14	10,14	12	10,11	10,11	10,11
	D3S1358	16	15,17	15,17	15,17	15,17	14	17	17	17
	TH01	9,3	7,9,3	9,3	9,3	9,3	6,8	8,9	8,9	8,9
	D13S317	11	11,12	11,12	11,12	11,12	11	13,14	13,14	13,14
	D16S539	12	11,13	11,13	11,13	11,13	13,14	10,12	10,12	10,12
	D2S1338	17,25	23,25	19,22	19,22	19,22	16,17	18,23	18,23	18,23
	D19S433	14	13	14,15	14,15	14,14.2	14,15.2	13,15	13,15	13,15
	vWA	15,20	15,17	13,16	13,16	10,13	16,17	15	15	15
	TPOX	8,9	9,12	8	8	8	9,10	8,12	8,12	8,12
	D18S51	15,19	17,19	16	16	10,2,12.2	17,21	17,19	17,19	17, <del>19</del>
	AMEL	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	D5S818	13	10,12	11,12	11,12	11,12	11,12	12	12	12
	FGA	22	22,23	22,23	22,23	21,22	21	19,25	19,25	19,25
Id Tumor Original			SI	SI	SI	22 SI + 4 de novo	SI	SI	SI	26 SI + 2 perdidos

A



T-MNG94

T-UC1

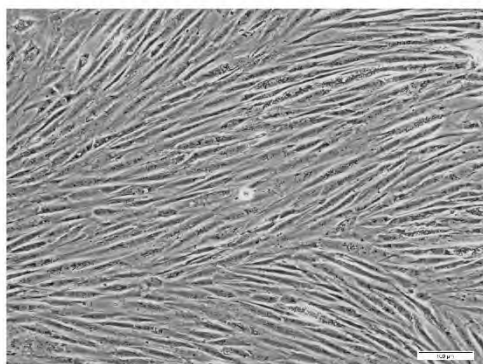
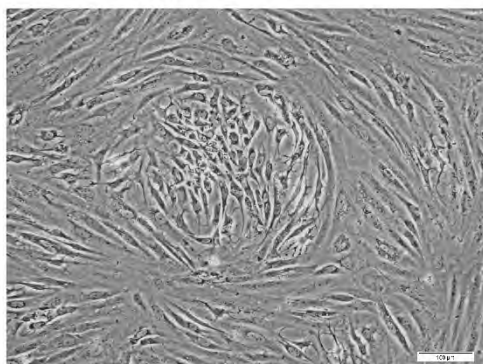


T-UC2

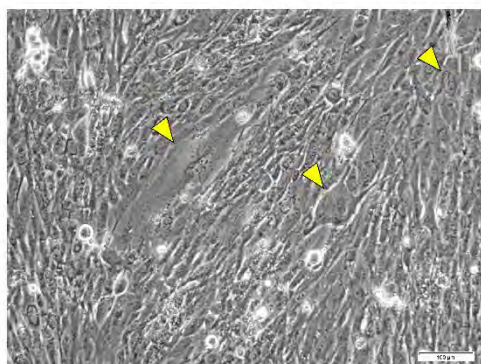


B

T-MNG178



T-MNG179



T-UC3

**Figura IV.8.** Cultivos primarios de tejido benigno (T-MNG) y de carcinoma anaplásico establecidos a partir de fragmentos independientes de sobrantes quirúrgicos de dos pacientes operados por esta enfermedad. A) De este paciente se establecieron dos cultivos anaplásicos T-UC1 y T-UC2 y un cultivo de tejido benigno T-MNG94. B) De este paciente se establecieron dos cultivos benignos (T-MNG178 y T-MNG179) y un cultivo anaplásico (T-UC3).

Como habíamos hecho anteriormente con las líneas celulares, lo primero fue evaluar la expresión de RNA de PIAS2 global, y de las isoformas PIAS2b y PIAS2a en cultivos de diferente origen que teníamos en ese momento en cultivo (Fig IV.9-A). Esta medición nos indicó que se deben expresar varias isoformas codificantes y no codificantes ya que PIAS2 global no coincide con el TaqMan específico para cada una de las isoformas codificantes. De nuevo, observamos que se expresa más PIAS2b que PIAS2a, y que los cultivos anaplásicos tienen menos que los de otros orígenes como tejido normal (T-NT), bocio multinodular (T-MNG) o carcinoma diferenciado papilar (T-PC). Para confirmar este dato, medimos cuatro grupos de cultivos diferentes a partir de nuestro banco de muestras previo obtenidos a partir de tejido normal de tiroides (T-NT, n=15), a partir de bocio multinodular (T-MNG, n=27), a partir de carcinoma diferenciado papilar (T-PC, n=24) y a partir de carcinoma anaplásico (T-UC, n=3 con replicados en distintos pases hasta 24 muestras). El grupo de cultivos papilar T-PC tenía significativamente más expresión de PIAS2b y los anaplásicos tenían significativamente menos expresión de PIAS2b y PIAS2a que los otros grupos (Fig IV.9-B).

Pasamos entonces a probar el efecto de nuestra secuencia en cultivos de carcinoma tiroideo (Tabla IV.12). La transfección de PIAS2b dsRNAi 1 fue capaz de reprimir la expresión de la proteína de forma efectiva en cultivos de diferente origen patológico (tejido normal de tiroides, bocio multinodular, carcinoma diferenciado papilar y carcinoma anaplásico), mientras que la secuencia control ns-dsRNAi no tenía efecto (Fig IV.9-C-F). Cuando lo comprobábamos a nivel de mRNA, la represión inducida por PIAS2b dsRNAi 1 era específica para la isoforma beta, sin alterar PIAS2a, (Fig IV.9-G).

Medimos el efecto biológico sobre el crecimiento de los cultivos a seis días tras la transfección, controlando que el % de células transfectadas fuera mayor del 50% en todos los casos, y en algunos cercano al 100% (Fig IV.9-H). Observamos que no había efecto ni diferencias entre PIAS2b dsRNAi 1 frente a ns-dsRNAi en cultivos de origen tiroides normal (T-NT), ni de hiperplasia autoinmune de Graves-Basedow (T-GD), ni de bocio multinodular (T-MNG), ni de carcinoma diferenciado

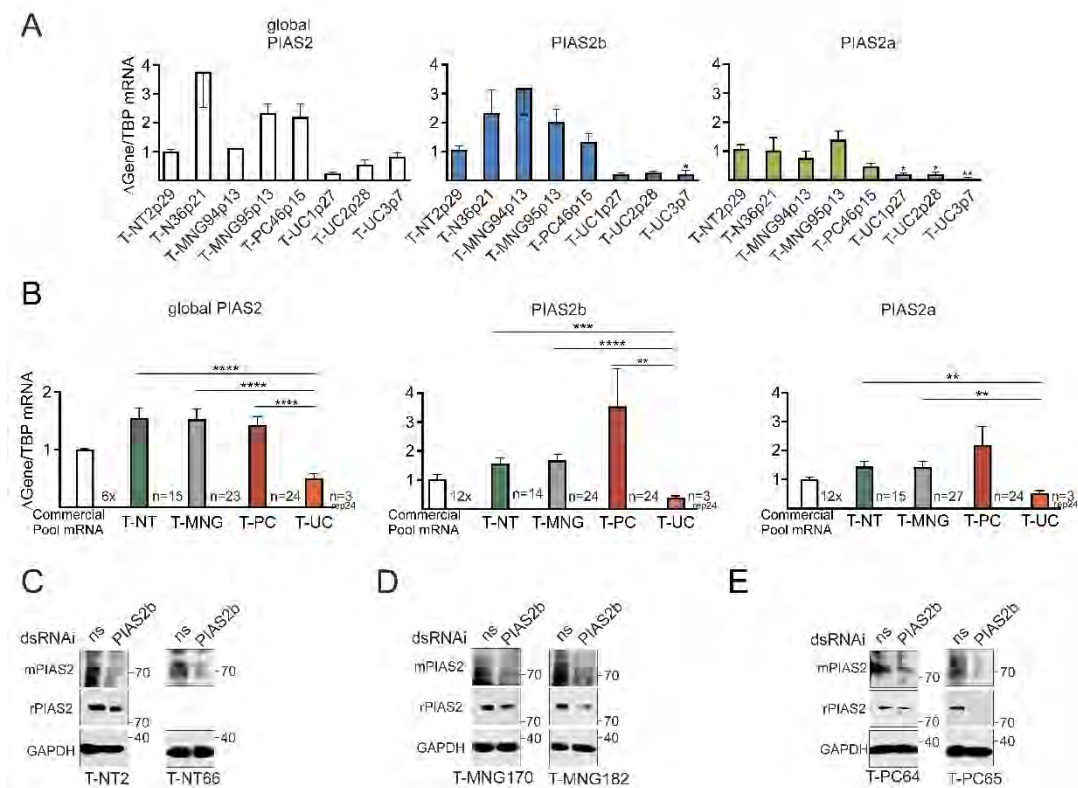


papilar (T-PC) aunque fuese metastásico (T-M), ni de carcinoma diferenciado folicular (T-FC) (Fig IV.9-H).

Sin embargo, en los tres cultivos anaplásicos establecidos a partir de fragmentos quirúrgicos independientes de los dos pacientes afectos, PIAS2b dsRNAi 1 tuvo un efecto masivo y significativo inhibiendo el crecimiento celular en más de un 90% a seis días tras la transfección (Fig IV.9-H). Con algunos cultivos repetimos el experimento midiendo a lo largo de los días a partir de la transfección, y comprobamos que las células transfectadas con ns-dsRNAi crecían a lo largo de los días, como también lo hacían las transfectadas con PIAS2b dsRNAi 1 en T-NT2 o T-MNG94, pero no así en los tres cultivos anaplásicos T-UC1, T-UC2 y T-UC3 que desde el día 1 comenzaban a disminuir el número de sus células (Fig IV.9-I-J).

**Tabla IV.12. Cultivos primarios de carcinoma: características de sus pacientes de origen.**

Culture	Genetic status (if known)	Patient	Pathology	Benign counterpart
T-UC1 T-UC2	TP53 P278R; NRAS Q61K Het TERT Promoter G228A Het	Woman, 68 years old Caucasic, spanish	ATC	Multinodular goitre, T-MNG94
T-UC3	TP53 (under study); RAS & BRAF wt TERT Promoter G228A Het	Woman, 76 years old Caucasic, spanish	ATC	Multinodular goitre, T-MNG178, T- MNG179
T-PC46	BRAF V600E Het; TERT Promoter WT	Woman, 55 years old Caucasic, spanish	PTC, tall cell variant	Multinodular goitre, T-MNG100
T-PC48	BRAF V600E Het; TERT Promoter WT	Woman, 39 years old Caucasic, spanish	PTC, classic variant	Normal thyroid, T-NT52
T-PC64	BRAF V600E Het; TERT Promoter WT	Woman, 48 years old Caucasic, spanish	PTC, classic variant, multifocal	Multinodular goitre, T-MNG197
T-PC65	BRAF V600E Het; TERT Promoter WT		PTC, classic variant	
T-M19	BRAF V600E Het; TERT Promoter WT	Woman, 44 years old Caucasic, spanish	Cervical lymph node, PTC	Normal thyroid, T-NT39
T-FC7	NRAS Q61K Het TERT Promoter WT	Woman, 43 years old Caucasic, spanish	FTC	Multinodular goitre, T-MNG82

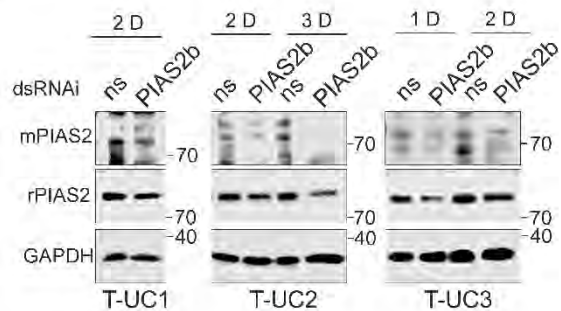


**Figura IV.9. PIAS2b dsRNAi 1 inhibe el crecimiento de cultivos primarios anaplásicos de pacientes, pero no de sus cultivos normales, de bocio o de carcinoma diferenciado.** A) Expresión de mRNA de PIAS2 total, y sus isoformas en cultivos de distinto origen patológico. B) Cuantificación de la expresión de PIAS2 en grupos de cultivo procedentes de tejido normal (T-NT), bocio multinodular (T-MNG) o carcinoma anaplásico (T-UC). C-F) PIAS2b dsRNAi 1 reprime la expresión de la proteína PIAS2b en cultivos derivados de T-NT (C), T-MNG (D), carcinoma diferenciado papilar (T-PC, E) y T-UC (F). G) PIAS2b dsRNAi 1 reprime específicamente la expresión del mRNA de PIAS2b, pero no de PIAS2a en T-NT y T-UC. H) Efecto de PIAS2b dsRNAi 1 frente al control ns-dsRNAi en la proliferación de cultivos de distinto origen patológico seis días después de transfectado. I-J) Efecto de PIAS2b dsRNAi 1 en la proliferación a lo largo del tiempo de cultivos de distinto origen. I) Cultivo de tiroides normal T-NT, y T-MNG94. J) Cultivos T-UC1 y T-UC2, y en T-UC3 (T-MNG94 procede del mismo paciente que T-UC1 y T-UC2).

(A: Media±SEM de un n=3. Kruskal-Wallis; B: En cada grafica se encuentra el tamaño muestral de cada grupo. Kruskal-Wallis G-I: Media±SEM de n=3 ANOVA de medidas repetidas; I: Media±SEM de un n=3 con 3 replicados por condición en cada experimento. ANOVA de medidas repetidas. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001).

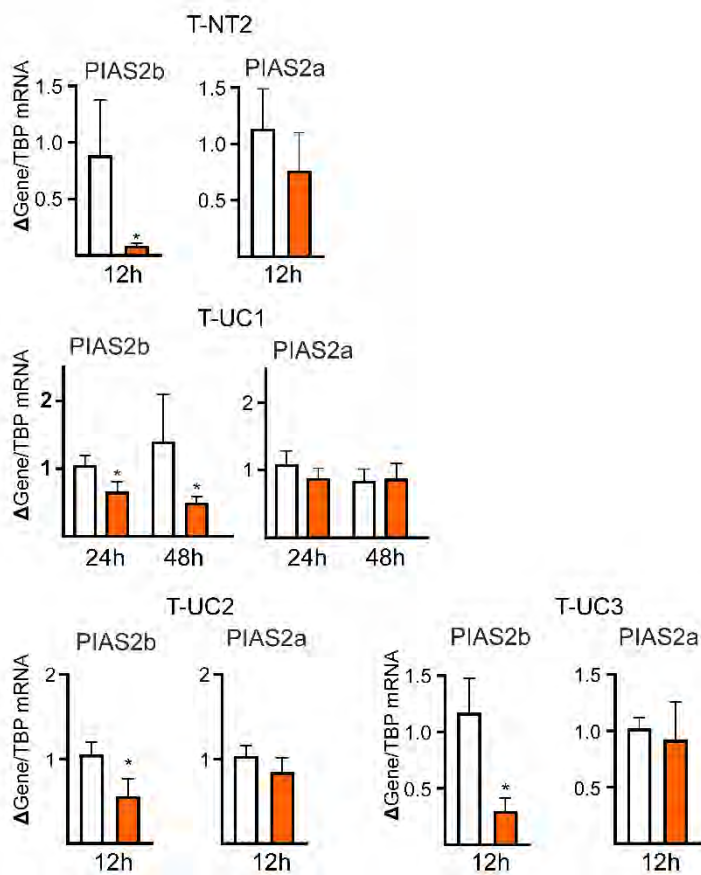
\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001).

**F**

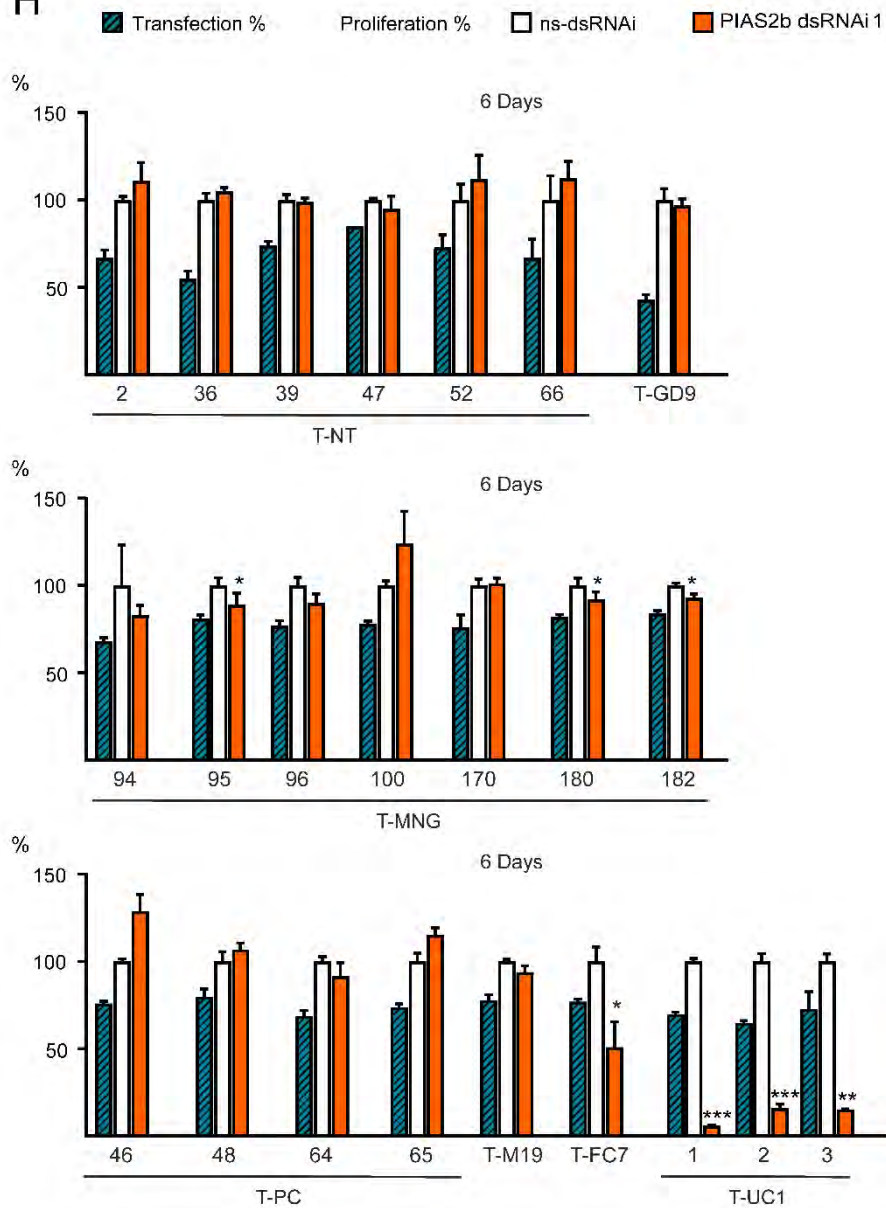


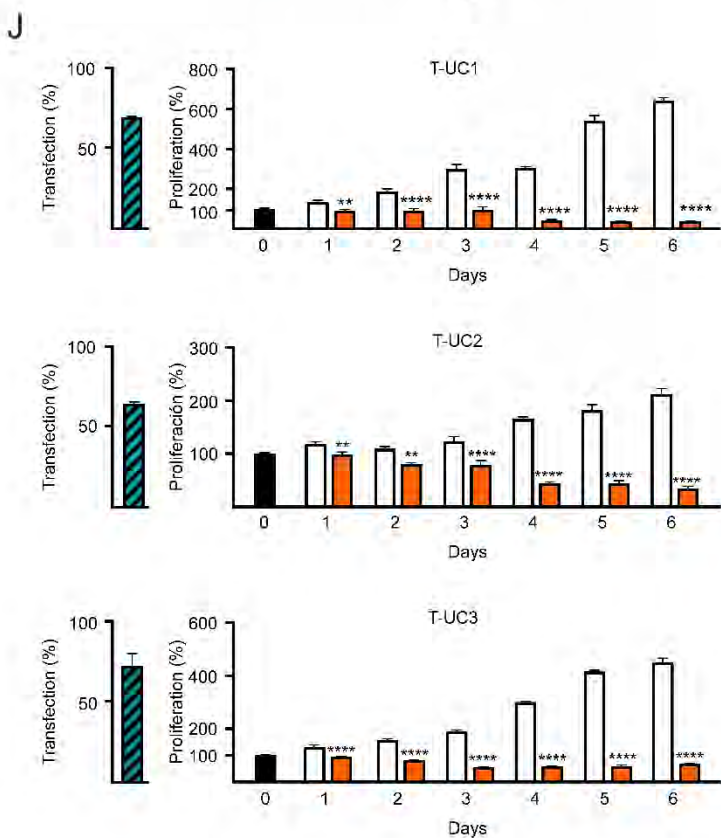
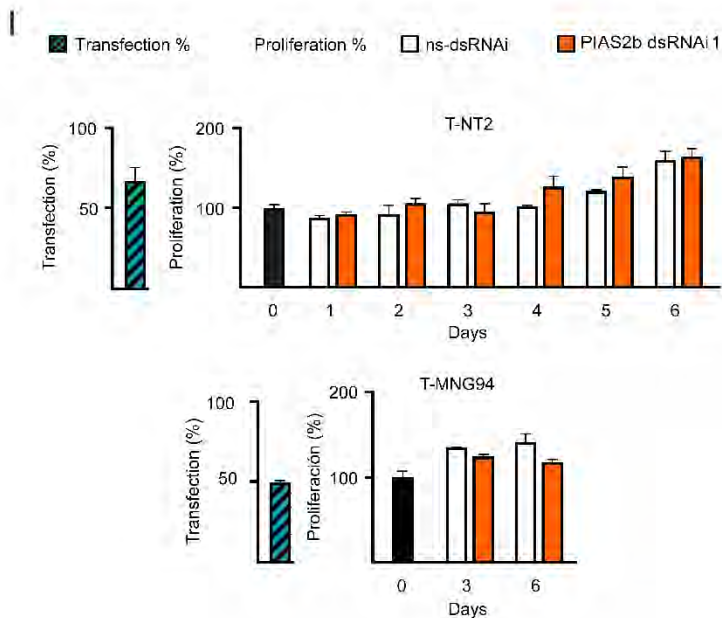
**G**

□ ns-dsRNAi      ■ PIAS2b dsRNAi 1

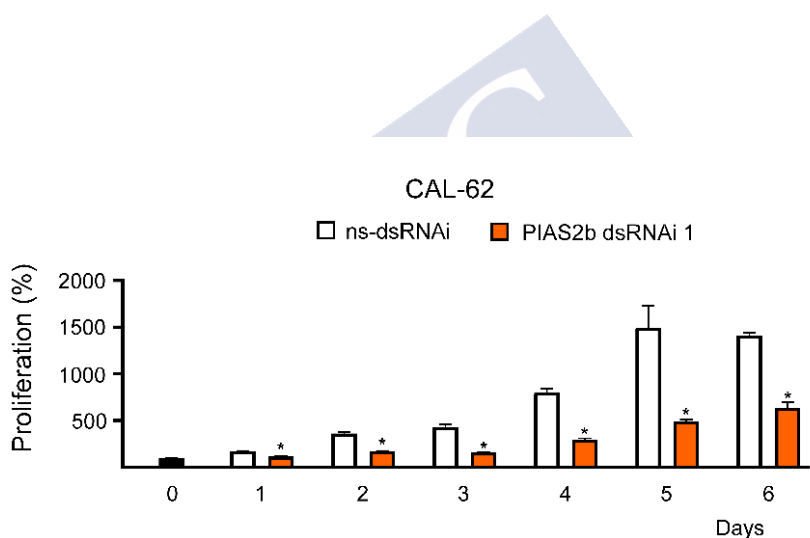


H





Una de las preguntas que nos hicimos fue ver cuánto duraba el efecto de una única transfección de PIAS2 dsRNAi 1 en una línea celular anaplásica, y cuando comenzaban a recuperarse teniendo en cuenta que estas células anaplásicas proliferan de forma rápida e incontrolada. Realizamos un experimento en CAL-62 comparando día a día el crecimiento celular (Fig IV.10). El efecto dura días, aunque a partir del día 5 se observa una recuperación lenta del crecimiento (Fig IV.10). Esto nos sugiere que tratando las células una vez por semana, como se hace en varias quimioterapias, podríamos tener posibilidades de control de estas células.



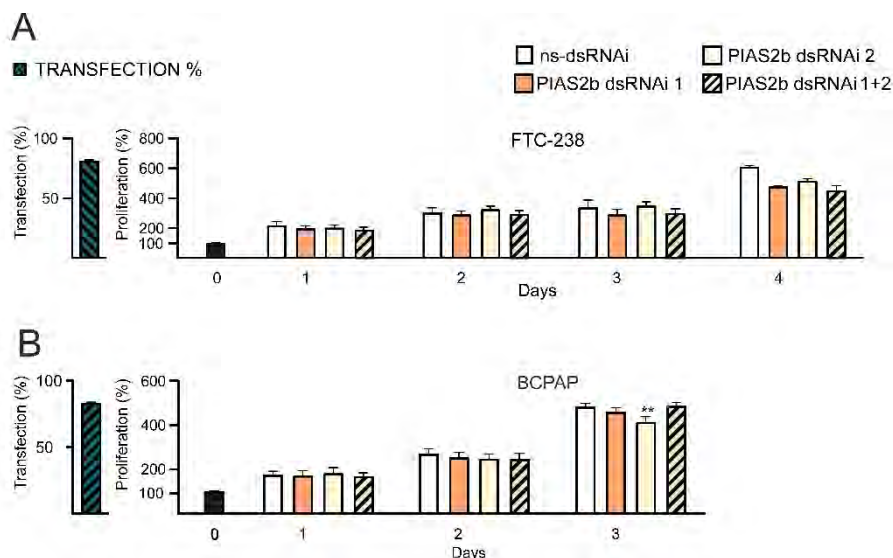
**Figura IV.10. PIAS2b dsRNAi 1 tiene un efecto que dura aproximadamente 5 días en línea celular.** Las células CAL-62 fueron transfectadas y su crecimiento fue evaluado día tras día. Mientras las células transfectadas con ns-dsRNAi crecen exponencialmente, las células con PIAS2b dsRNAi 1 se mantienen sin crecer durante al menos cuatro-cinco días. A partir del día 5 vemos que las células tratadas con PIAS2 empiezan a crecer, pero todavía conservando diferencias con los controles. (Media±SEM de un n=3 con 3 replicados por condición en cada experimento. ANOVA de medidas repetidas. \*,  $p < 0.05$ ).

Ante un efecto biológico tan característico, es importante estudiar si hay un efecto dosis-respuesta. Estudiamos entonces los efectos de PIAS2 dsRNAi 1 y 2 o su combinación a la mitad de concentración (70

nm) en las mismas líneas celulares y algunos cultivos primarios que en las Figuras IV.7. y IV.9. Como se puede observar en la Figura IV.11, la dosis intermedia de PIAS2 dsRNAi 1, 2 o su combinación siguen sin tener efecto en las líneas de carcinoma diferenciado avanzado folicular FTC-238 o papilar BCPAP (Fig IV.11-A-B). Sin embargo, en las cuatro líneas de anaplásico 8305C, CAL-62, BHT-101 y MB1 la concentración intermedia de PIAS2 dsRNAi 1, 2 o su combinación también tuvieron un significativo efecto inhibitor del crecimiento celular pero no en todas las secuencias o líneas (Fig IV-11-C-D). Las células CAL-62 y BHT-101 perdían el efecto para la secuencia 2 o la mezcla de secuencias 1 y 2.





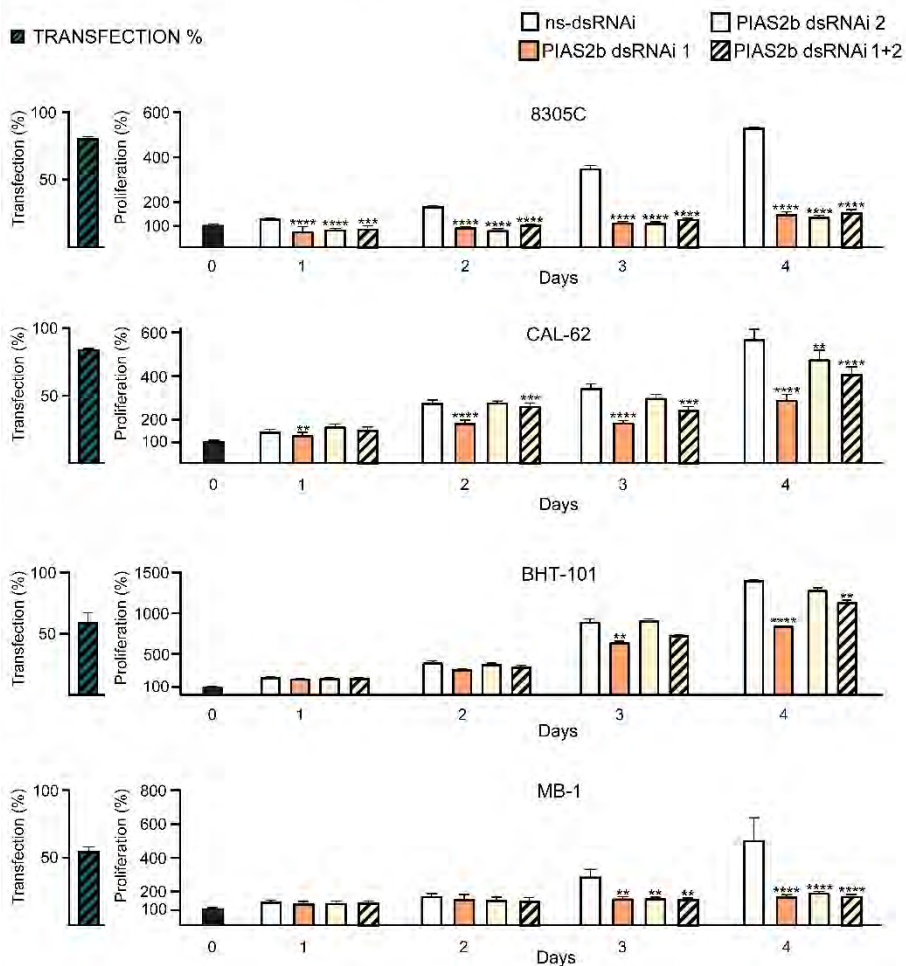


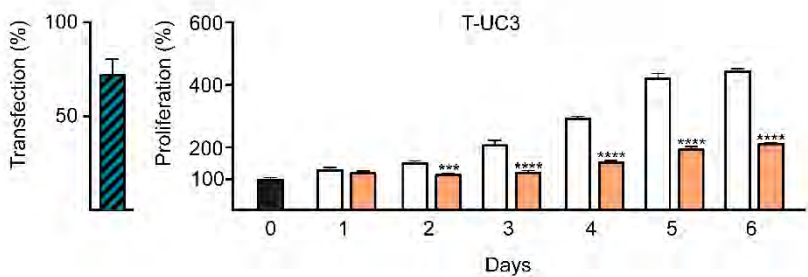
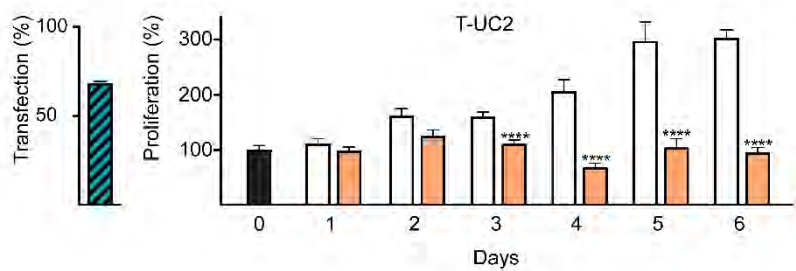
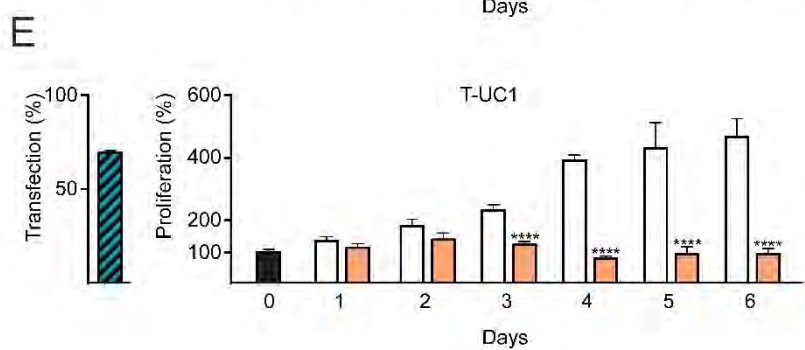
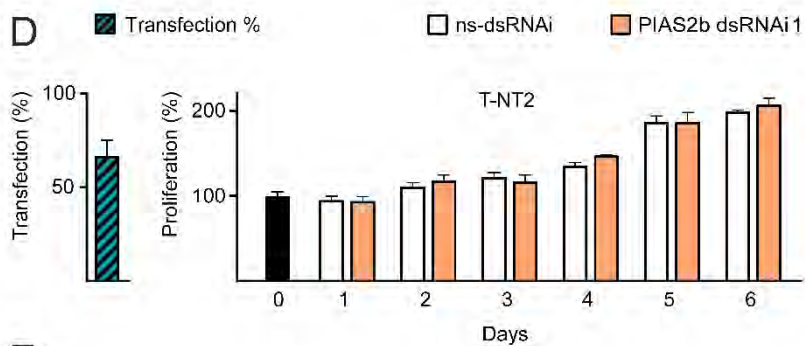
**Figura IV.11. PIAS2b dsRNAi 1, 2 o la combinación de 1+2 a la mitad de dosis (70 nM) inhiben el crecimiento de líneas celulares y cultivos primarios anaplásicos de pacientes con menos potencia que a dosis máxima. A) Efecto de PIAS2 ds RNAi 1, 2 o la combinación de ambas a dosis intermedia en A) FTC-238, B) BCPAP, C) las cuatro líneas celulares de anaplásico 8305C, CAL-62, BHT-101 y MB-1, D) el cultivo de tiroides normal T-NT2, E) los cultivos primarios de carcinoma anaplásico T-UC1, T-UC2 y T-UC3. (Media±SEM de un n=3 con 3 replicados por condición en cada experimento. ANOVA de medidas repetidas; \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001).**



C

## Anaplastic Thyroid Carcinoma





Como resumen de los experimentos de crecimiento celular y los efectos que sobre este tiene la represión de la expresión de PIAS2 con dsRNAi se muestra la Tabla IV.13.

Tabla IV.13. Porcentaje máximo de inhibición del crecimiento celular y el día de mayor inhibición de los tratamientos con PIAS2 dsRNAi 1, 2 o su combinación frente a ns-dsRNAi

LINEAS CELULARES	Máxima inhibición con PIAS2b dsRNAi 1 (%)		Día Máxima inhibición PIAS2b dsRNAi 1 (%)		Máxima inhibición con PIAS2b dsRNAi 2 (%)		Día Máxima inhibición PIAS2b dsRNAi 2 (%)		Máxima inhibición con PIAS2b dsRNAi 1+2 (%)		Día Máxima inhibición PIAS2b dsRNAi 1+2 (%)	
	140 nM	70 nM	140 nM	70 nM	140 nM	70 nM	140 nM	70 nM	140 nM	70 nM	140 nM	70 nM
8305C	94	72	4	4	89	75	4	4	89	70	4	4
CAL-62	66	49	4	4	25	16	4	4	58	28	4	4
BHT-101	72	28	4	3	47	8	4	4	54	19	4	4
MB-1	67	66	4	4	73	62	4	4	74	65	4	4
BCPAP	8	5	4	3*	68	14	3	3*	57	8	4	2*
FTC-238	20	22	4	4	12	15	4	4	12	26	4	4
CULTIVOS PRIMARIOS												
T-NT2	9	4	3	3								
T-UC1	94	80	6	6								
T-UC2	83	69	6	6								
T-UC3	85	54	6	5								

Los experimentos de líneas celulares se realizaron durante un curso temporal de cuatro días. Los experimentos de cultivo primario se realizaron durante un curso temporal de seis días.

**Valores en color:** datos con significación estadística respecto a su control ns-dsRNAi. Azul: significación estadística respecto a su control; Rojo: significación estadística respecto al control, pero también cuando se comparan la dosis alta d 140 nM con la dosis baja de 70 nM de PIAS2 dsRNAi. Marrón: sin significación estadística respecto al control dsRNAi pero sí respecto a la concentración mayor de PIAS2 dsRNAi.

\*sólo se realizó durante tres días

Se observa claramente que las condiciones de máxima eficiencia anticancerosa, manteniendo la especificidad para cáncer anaplásico, son la secuencia PIAS2 dsRNAi 1 a 140 nM.

#### ***IV.7 Sobreexpresión de PIAS2b o PIAS2a también tiene un efecto tóxico***

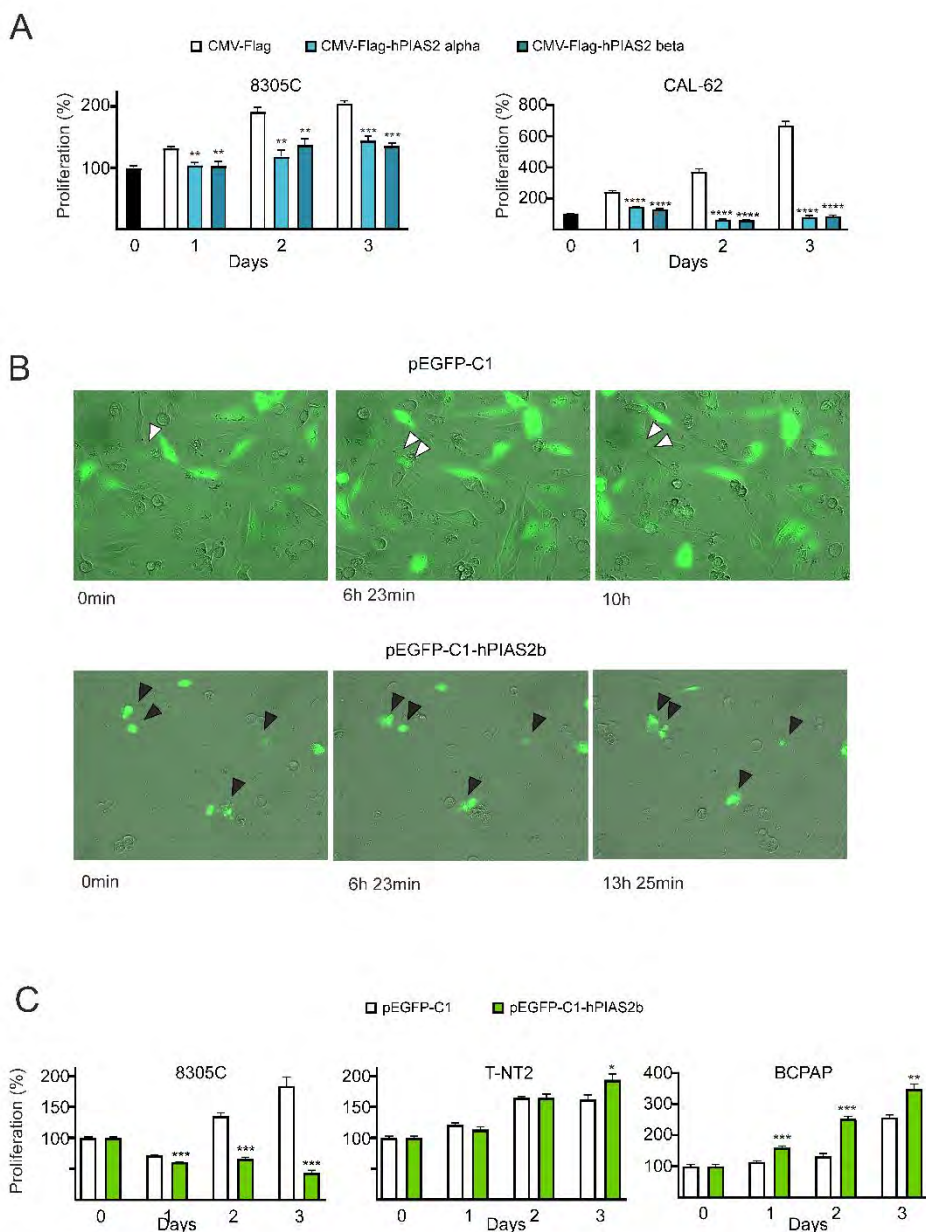
Uno de los posibles experimentos para demostrar especificidad de un siRNA es co-expresar la proteína diana y observar la pérdida del efecto. Nosotros intentamos hacer este experimento, pero nos dimos cuenta de que cuando transfectábamos las células con cualquiera de las isoformas proteicas de PIAS2 teníamos menos células, y éstas crecían muy poco.

Decidimos hacer un experimento controlado de proliferación en células anaplásicas transfectadas con vector vacío frente a transfectadas con Flag-hPIAS2a y Flag-hPIAS2b (Fig IV.12-A). La expresión de cualquiera de estas dos proteínas bloqueaba el crecimiento en 8305C e incluso era tóxica en CAL-62 puesto que a lo largo de los días se iban perdiendo células con respecto a las sembradas inicialmente.

Para comprobarlo con más detalle transfectamos las 8305C con el plásmido control pEGFP-C1 y con pEGFP-C1-hPIAS2b que expresa una proteína quimera que tiene EGFP en el extremo N-terminal seguida “in frame” de la proteína hPIAS2b. Seguimos a las células por *time-lapse* y observamos que mientras las células expresando EGFP se dividían normalmente a lo largo de las horas, las que expresaban EGFP-hPIAS2b quedaban colapsadas por horas y morían (Fig IV.12-B).

Lo más interesante es que cuando cuantificamos este efecto por ensayo de crecimiento celular observamos que sólo pasaba esto en las células anaplásicas (8305C) pero no afectaba a las células normales (T-NT2) o de carcinoma pobremente diferenciado/papilar (BCPAP) (Fig IV.12-C).

Nuestra conclusión con los experimentos hasta el momento es que la expresión de PIAS2 en células anaplásicas de tiroides está muy constreñida y su disminución (dsRNAi) o aumento (sobreexpresión) provoca muerte de forma específica en este tipo de células cancerosas sin afectar a las células de cáncer diferenciado, proliferación benigna o tiroides normal.



**Figura IV.12. Sobreexpresión de PIAS2 en cualquiera de sus dos isoformas de la proteína causa toxicidad en las células anaplásicas de tiroides.** A) Las células 8305C y CAL-62 fueron transfectadas con plásmidos expresando Flag-PIAS2b, Flag-PIAS2a o su vector vacío CMV-Flag. Se midió el crecimiento celular a lo largo de los días. B) Las células 8305C se transfectaron con el vector de expresión de la proteína quimera EGFP-C1-hPIAS2b o su vector vacío EGFP-C1 y se siguieron por time-lapse a lo largo de las siguientes 24 horas. Flechas blancas: una célula expresando EGFP que se divide. Flechas negras: células expresando EGFP-C1-hPIAS2b que se colapsan por horas y mueren. C) Cuantificación del efecto de EGFP-C1-hPIAS2b medido por ensayo MTT de proliferación en la línea anaplásica 8305C frente a normal T-NT2 o de carcinoma pobremente diferenciado/papilar BCPAP. (A-C: Media $\pm$ SEM de un n=3 con 3 replicados por condición en cada experimento. ANOVA de medidas repetidas. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001).

#### ***IV.8 Efectividad de otros métodos comerciales para reprimir la expresión de PIAS2b***

Nuestra secuencia PIAS2 dsRNAi específica de isoforma tenía un efecto anticanceroso potente y específico de células anaplásicas. Nuestro siguiente paso fue preguntarnos si era importante que la secuencia fuera dirigida a la isoforma PIAS2b y si era importante la forma en la que la producíamos, como doble cadena de RNAi transcrita *in vitro*. Este sistema es además tedioso de producir a gran escala.

Buscamos otros sistemas comerciales que técnicamente fuesen compatibles y funcionales en células que creciesen de forma muy rápida como son las células anaplásicas. Tras evaluar varios sistemas seleccionamos dos: 1) represión de PIAS2b tras infección viral y expresión inducida de un *hairpin* shRNA, y 2) represión mediante oligonucleótidos LNA.

El sistema inducible TRIPZ-human shRNA (Dharmacon, Inducible Dharmacon™ TRIPZ™ Lentiviral shRNA manual) permite la generación de lentivirus que infectan a las células.

Tras la administración de una dosis de Doxiciclina compatible con el crecimiento celular, se induce la expresión del shRNA *hairpin* (*Tet-on*) al mismo tiempo que se induce la expresión de la proteína fluorescente roja (RFP).

El sistema está basado en un vector lentiviral que contiene un promotor regulado por “Tetraciclina” (*Tet promoter*) que dirige la expresión de transcrito de fusión RFP-shRNA, con el shRNA actuando como 3'UTR (Naughton et al, 2011). El vector tiene dos sitios BspQ1 entre la región 5'mir30 y 3'mir30 donde se clonan con cierta facilidad oligonucleótidos de doble cadena con las secuencias shRNA. El vector tiene un segundo promotor de la Ubiquitin C (*UBC promoter*) que dirige la expresión del transactivador rtTA3 regulado por la Doxiciclina/Tetraciclina, asociado a un IRES y el gen de la resistencia a Puomicina (*puromycin N-acetyl-transferase, PAC*).

En la Tabla IV.14 se muestran las isoformas de mRNA de PIAS2 potencialmente reconocidas por T-PIAS2\_shRNA. Para

PIAS2b, aunque no son todas, se interfieren todas las proteicas de PIAS2b del Ensembl (Zerbino et al, 2018; <https://www.ensembl.org>), pero sólo parcialmente las isoformas PIAS2b del NCBI (Sayers al, 2019; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para PIAS2a sí que se interfieren casi todas las de ambos consorcios. Lo mismo sucede para PIAS-NY. Sólo se interfieren parcialmente las codificantes de péptidos y no codificantes.





Tabla IV.14. Isoformas de mRNA de PIAS2 sobre las que actúa T-PIAS2\_shRNA.

Gene ENSEMBL ID	RNA Name ENSEMBL	Transcript ID ENSEMBL	bp ENSEMBL	Protein ENSEMBL	Biotype ENSEMBL	Gene NCBI ID	RNA Refseq NCBI	RNA Name NCBI	Protein Refseq NCBI	Protein Name NCBI
ENSG00000078043	PIAS2-204	ENST00000585916.5	11075	621aa	Protein coding	NM_001324046	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 4, mRNA		NP_001310975	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 4
						NM_001324047	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 5, mRNA		NP_001310976	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
						NM_001324048	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 6, mRNA		NP_001310977	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
						NM_001324049	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 7, mRNA		NP_001310978	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
						NM_001354034	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 19, mRNA		NP_001340963	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 10
						NM_001354035	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 20, mRNA		NP_001340964	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
						NM_001354036	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 21, mRNA		NP_001340965	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 6
						NM_001354038	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 27, mRNA		NP_001340967	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
						NM_001354039	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 28, mRNA		NP_001340968	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 5
						NM_004671	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant beta, mRNA		NP_004662	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform beta
	PIAS2-201	ENST00000324794.11	4543	572aa	Protein coding	NR_148700	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 24, non-coding RNA			
						NR_148701	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 25, non-coding RNA			
						NR_148703	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 29, non-coding RNA			
						NM_001324051	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 9, mRNA		NP_001310980	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
						NM_001324052	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 9, mRNA		NP_001310981	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
						NM_001324053	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 10, mRNA		NP_001310982	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
						NM_001324054	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 11, mRNA		NP_001310983	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
						NM_001324058	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 15, mRNA		NP_001310987	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 9
						NM_001354033	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 18, mRNA		NP_001340962	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 7
						NM_173206	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant alpha, mRNA		NP_775298	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform alpha
	PIAS2-215	ENST00000592212.5	2790	536aa	Protein coding	NR_148699	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 22, non-coding RNA			
						NM_001324055	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 12, mRNA		NP_001310984	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
						NM_001324057	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 13, mRNA		NP_001310986	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
						NM_001324059	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 14, mRNA		NP_001310988	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
						NM_001324060	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 3, mRNA		NP_001310989	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
						NM_001354037	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 23		NP_001340966	E3 SUMO-protein ligase PIAS2 isoform 8
						NR_136685	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 17, non-coding RNA			
	PIAS2-202	ENST00000398654.7	2043	182aa	Nonsense mediated decay	NR_136684	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 16, non-coding RNA			
						NR_148702	Homo sapiens protein inhibitor of activated STAT 2 (PIAS2), transcript variant 26, non-coding RNA			
	PIAS2-203	ENST00000545673.5	1590	282aa	Protein coding					
	PIAS2-210	ENST00000589917.1	561	122aa	Protein coding					
	PIAS2-216	ENST00000592221.5	502	89aa	Protein coding					
	PIAS2-207	ENST00000586953.1	497	88aa	Protein coding					
	PIAS2-208	ENST00000587810.1	447	95aa	Protein coding					
	PIAS2-212	ENST00000590944.1	404	No protein	Processed transcript					
	PIAS2-205	ENST00000586170.1	332	No protein	Processed transcript					
	PIAS2-211	ENST00000590127.5	1838	No protein	Retained intron					
	PIAS2-214	ENST00000592011.5	1394	No protein	Retained intron					
	PIAS2-209	ENST00000589819.1	589	No protein	Retained intron					
	PIAS2-206	ENST0000058634.1	585	No protein	Retained intron					
	PIAS2-213	ENST00000591865.1	515	No protein	Retained intron					



Compramos pues los dos plásmidos T-PIAS2\_shRNA y T-Scr\_shRNA que contenía la secuencia control recomendada sin diana *Scramble* (Scr, *off-target*). Mediante vectores complementarios de Addgene, preparamos en nuestro laboratorio partículas virales de alto título, medido por PCR cuantitativa y ensayos funcionales en HEK293T. Mientras tanto mediante un experimento dosis-respuesta con Doxyciclina en nuestras células de cáncer de tiroides anaplásico (CAL-62) buscamos concentraciones que no afectasen el crecimiento celular (1 y 2 microg/mL).

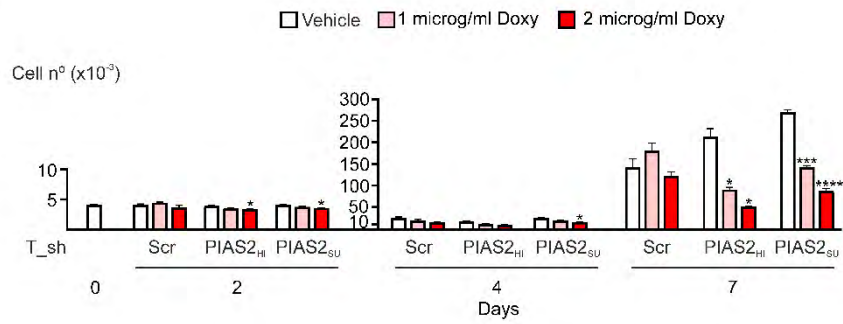
En un primer experimento infectamos a las células CAL-62, y seleccionamos con Puromicina. Los clones resistentes se mezclaron en poblaciones que, en el siguiente pase, se compararon en ausencia/presencia de Doxyciclina. Desgraciadamente, la variabilidad de expresión de RFP fue muy grande con células muy intensas y células absolutamente negativas, a pesar de la selección con Puromicina.

Decidimos entonces utilizar selección por *sorter* tras citometría de flujo. Tras añadir Doxyciclina (o no, a los controles de fluorescencia) durante la noche, al día siguiente seleccionamos dos poblaciones que tuviesen alta intensidad de RFP (T-PIAS2<sub>HI</sub>\_shRNA y una segunda población todavía con más intensidad T-PIAS2<sub>SU</sub>\_shRNA. Lo mismo hicimos con la población control T-Scr\_shRNA, aunque nunca tuvimos ninguna diferencia posterior entre ellas en crecimiento a lo largo del tiempo, por lo que sólo se usó una para los experimentos (datos no mostrados).

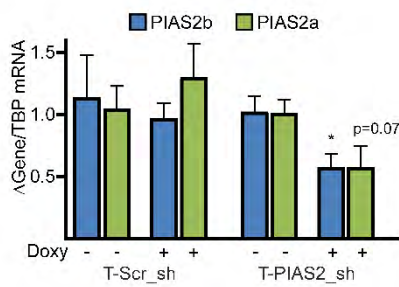
En la figura IV.13 se muestran los resultados obtenidos de los subsiguientes experimentos con estas poblaciones. La adición de Doxyciclina tuvo un significativo efecto inhibitor del crecimiento en las dos poblaciones que expresan T-PIAS2\_shRNA, pero no en las que expresan T-Scr\_shRNA (Fig IV.13-A). El máximo efecto es de un 75% de inhibición a los 7 días con la máxima dosis de Doxyciclina.



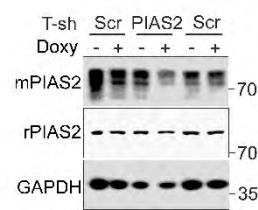
A



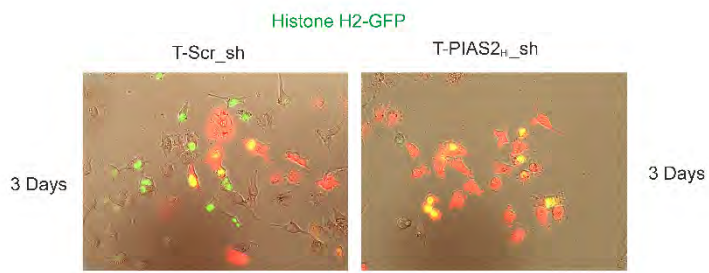
B



C

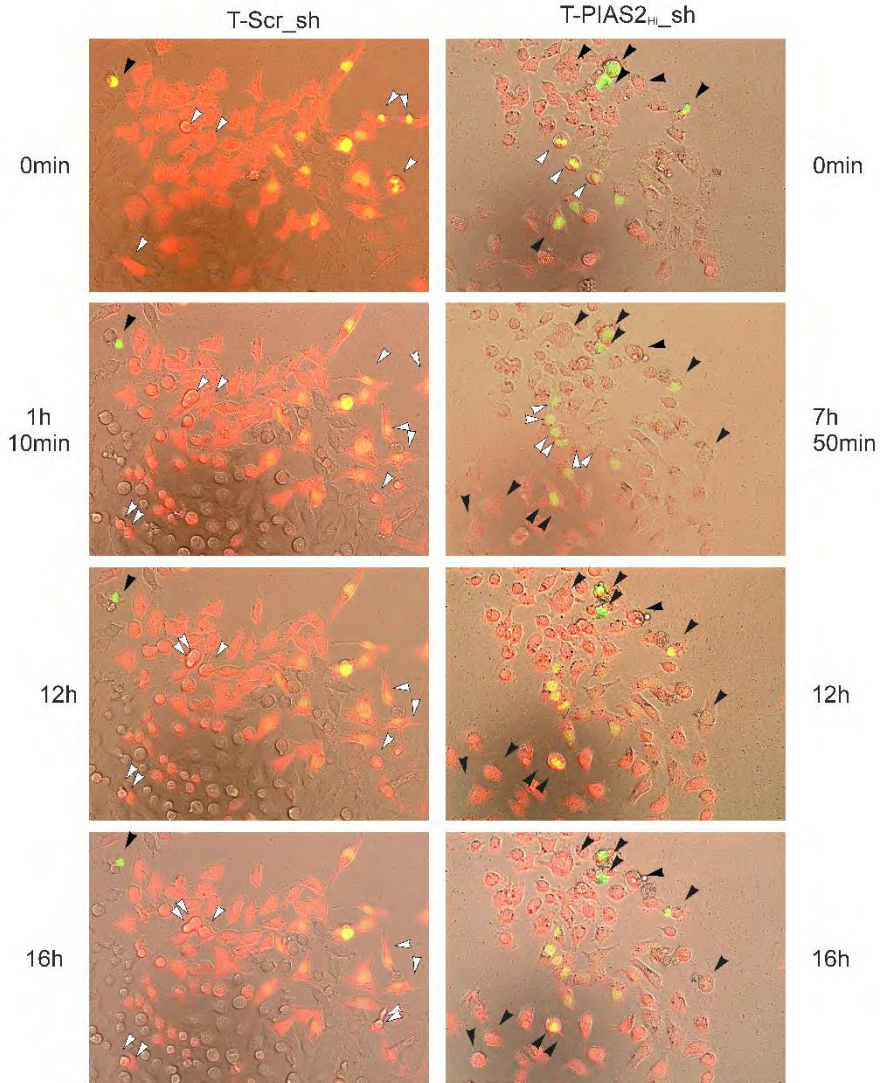


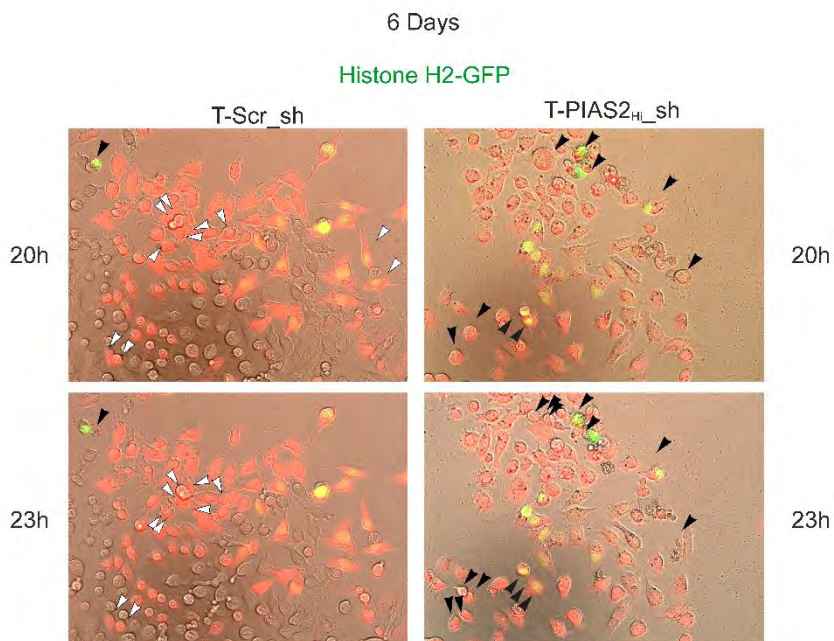
D



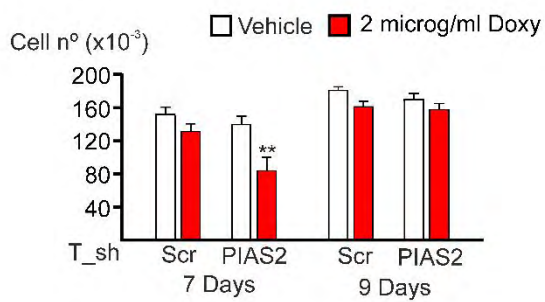
6 Days

Histone H2-GFP





**E**



**Figura IV.13. La expresión de shRNA contra PIAS2 en células CAL-62 reduce la proliferación impidiendo la división celular, pero el efecto es moderado y poco duradero en el tiempo.** A) Poblaciones infectadas con lentivirus seleccionadas por su intensidad en fluorescencia RFP, expresando la secuencia control T-Scr\_shRNA y dos poblaciones expresando la secuencia T-PIAS2\_shRNA, y con intensidad creciente para RFP en el *sorter*: T-PIAS2<sub>HI</sub>\_sh y T-PIAS2<sub>SU</sub>\_sh. Las células fueron tratadas con vehículo y dos concentraciones de Doxyciclina que inducen el shRNA. B) RT-PCR de la expresión de las dos isoformas de PIAS2 codificantes de proteína PIAS2b y PIAS2a en ausencia o presencia de 2 microg/ml de Doxyciclina en la población control T-Scr\_sh y la población T-PIAS2<sub>HI</sub>\_sh. C) *Western blot* para p75 PIAS2b con mPIAS2 y rPIAS2 en presencia o ausencia de Doxyciclina. D) Registro por video *Time-lapse* de las células control T-Scr\_sh y las células T-PIAS2<sub>HI</sub>\_sh. Las células fueron transitoriamente transfectadas con un vector para expresar Histona2-GFP y poder seguir mejor algunas células individuales. Flechas blancas: células que se dividen exitosamente a lo largo del tiempo. Flechas negras: células que quedan paradas sin dividirse durante horas. E) Experimento tiempo-respuesta a 7 y 9 días.

(A: Media±SEM de un n=3 con 3 replicados por condición en cada experimento. ANOVA de medidas repetidas; B: Media±SEM de un n=3. T-test. E: Media±SEM de un n=3 con 3 replicados por condición en cada experimento. ANOVA de medidas repetidas.

\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001).





La secuencia PIAS2\_shRNA está dirigida a la parte codificante común a todas las isoformas proteicas del RNA de PIAS2; buscada en BLAST (Sayers et al, 2019; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) sería capaz de interactuar contra 5 de las 16 isoformas de PIAS2, todas codificantes PIAS2-204 (PIAS2b), PIAS2-201 (PIAS2a), PIAS2-215 (PIAS-NY), PIAS2-203 (fragmento de 282 aa) y PIAS2-202 (fragmento de 182, *nonsense mediating decay*). De hecho, al medir por qRT-PCR TaqMan la expresión de RNA específico de isoforma vimos que la Doxyciclina reprime la expresión de PIAS2b y PIAS2a en la población T-PIAS2<sub>HI</sub>\_sh, pero no en la población T-Scr\_sh (Fig IV.13-B). Mediante *western blot* vimos que había represión de la proteína PIAS2b tanto con el anticuerpo mPIAS2 como con el rPIAS2, (Fig IV.13-C).

Como las células que expresaban shRNA se volvían fluorescentes, quisimos observarlas en experimentos de video time-lapse. Para tener ciertas referencias en cada campo, realizamos una transfección transitoria de una pequeña cantidad de Histona H2-GFP que permite observar algunos núcleos verdes al ser una proteína de fusión (Fig IV.13-D). En la población T-Scr\_sh podemos ver como a lo largo de las horas seis días tras la adición de Doxyciclina, las células están rojo intenso, algunas con su núcleo en verde, y se van dividiendo sin problema a lo largo del tiempo (Fig IV.13-D izquierda, flechas blancas simples o dobles). Sin embargo, en la población T-PIAS2<sub>HI</sub>\_sh muy pocas células están rojo intenso; además, las células o bien no se dividen o intentan dividirse (forma redondeada y menos pegada al plato) pero quedan paradas durante horas en la misma situación (Fig IV.13-D derecha, flechas negras simples o dobles).

El shRNA parece comportarse de forma similar al dsRNAi, y podría sernos de utilidad para experimentos a corto plazo. Sin embargo, el sistema no sirve a largo plazo ya que cuando se dejan durante 9 días las células con Doxyciclina han recuperado el crecimiento de los controles sin Doxyciclina (Fig IV.13-E).

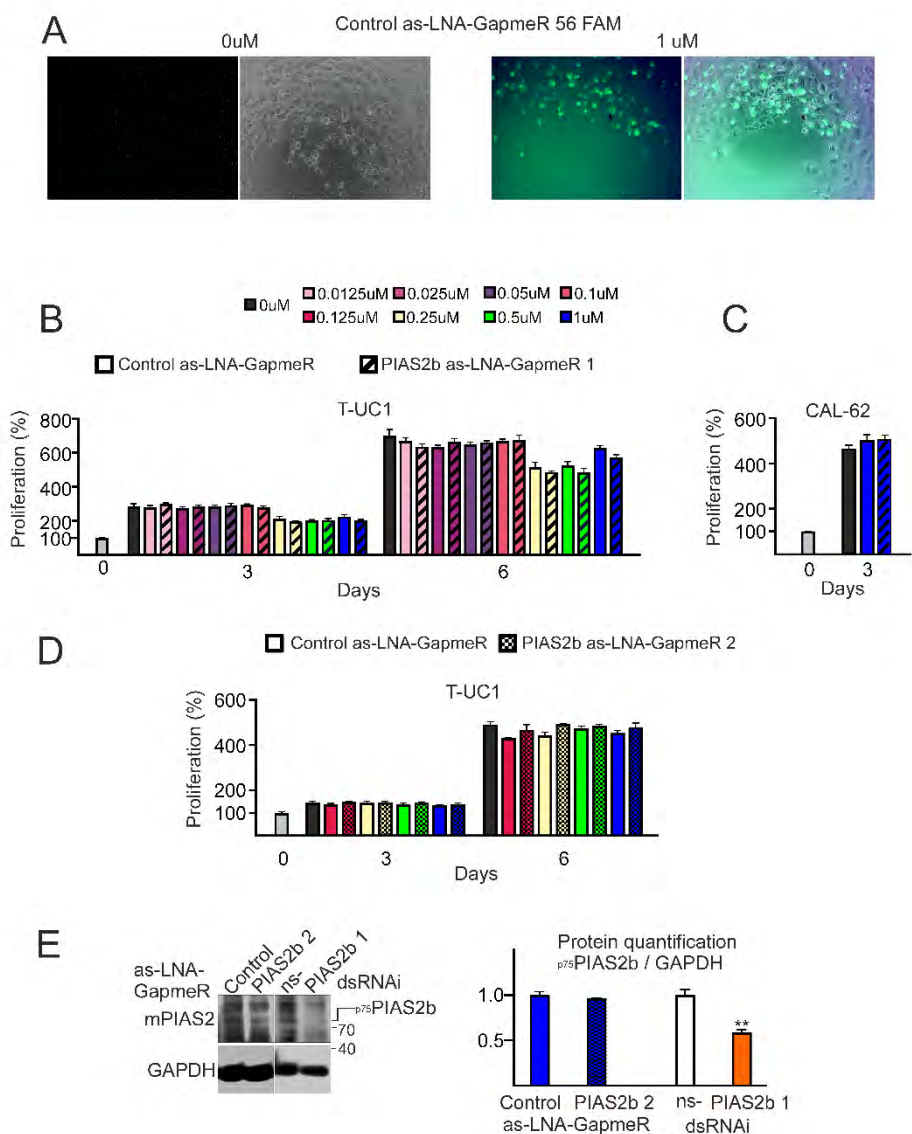
Decidimos entonces probar un nuevo sistema comercial de interferencia con RNA basado en oligonucleótidos modificados de

larga vida media y que aparentemente pueden entrar directamente en las células sin necesidad de lípidos, los as-LNA-GapmeR (*Locked Nucleic Acids single-stranded antisense oligoribonucleotides*, [www.quiagen.com](http://www.quiagen.com)). Su estructura está modificada de forma que la “ribosa” está químicamente fijada (*locked*) haciéndolos muy estables. Por otra parte, se diseñan como secuencias oligonucleotídicas antisentido monocatenarias, para que dentro de la célula se unan al mRNA diana e induzcan degradación vía RNasa H, sin necesidad de procesamiento previo por el complejo RISC. Y, lo más interesante para nosotros, es que parece que son captados por la célula de forma simple sin necesidad de lípidos u otros reactivos de transfección.

Se ha demostrado que entran y reprimen eficientemente la expresión del gen diana *in vitro* en células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231 (Xing et al, 2014) y en células de cáncer de riñón y pulmón (Ali et al, 2018). Los as-LNA-GapmeR se proponen además para terapias *in vivo* puesto que en modelos animales se administran por vía subcutánea (Ali et al, 2018) o sistémica (Xing et al, 2014) son efectivos en la represión de genes en xenografts y PDX. Aunque son muy caros, sus ventajas son obvias en caso de futura aplicación clínica y por tanto decidimos hacer un set de experimentos con ellos. Como era un experimento caro, utilizamos como modelo celular directamente el cultivo de carcinoma anaplásico del paciente T-UC1.

Lo primero que hicimos fue comprobar que los as-LNA-GapmeR entraban en nuestras células de forma pasiva como la compañía indicaba. Para ello usamos un oligo control (*off-target*) modificado que estaba marcado con un fluorocromo ya suministrado por ellos. Dos días después de la adición del control as-LNA-GapmeR 56 FAM las células presentaban fluorescencia intensa (Fig IV.14-A).





**Figura IV.14. Efecto de oligonucleótidos comerciales as-LNA-GapmeR en la represión de PIAS2 y sus efectos en proliferación.** A) Microfotografía de las células T-UC1 2 días tras la adición al medio de as-LNA-GapmeR 56 FAM. B) Proliferación de las células T-UC1 en presencia en el medio de un amplio rango de concentraciones de PIAS2b as-LNA-GapmeR 1 frente a células en presencia de Control as-LNA-GapmeR en rango similar. C) Células CAL-62 en presencia de la máxima dosis de los correspondientes PIAS2b as-LNA-GapmeR 1 o su control. D) Proliferación de las células T-UC1 en presencia de medio conteniendo un amplio rango de concentraciones de PIAS2b as-LNA-GapmeR 2 frente a células en presencia de Control as-LNA-GapmeR en rango similar. E) Western blot anti-PIAS2 en células T-UC1 (Media $\pm$ SEM de n=5. ANOVA de medidas repetidas. *Non significant* en B-C-D. E: T-test. \*\*, p<0.01).

La compañía que los diseña y sintetiza tiene una serie de secuencia concretas elegidas para cada gen humano. Como no eran específicas de isoforma decidimos que primero nos prepararan un PIAS2 as-LNA-GapmeR 1 diseñado por ellos en la secuencia UTR de PIAS2b. Siguiendo sus recomendaciones probamos *in vitro* un rango amplio de concentraciones comparadas siempre contra el oligo control asLNA-GapmeR. PIAS2 as-LNA-GapmeR 1 no inhibió la proliferación en ninguna de las concentraciones testadas en T-UC1 (Fig IV.14-B). Tampoco la máxima concentración tuvo efecto en una línea celular anaplásica CAL-62 (Fig IV.14-C). La compañía nos indicó que mejor probásemos entonces con la secuencia más probable resultante de sus algoritmos para el gen PIAS2. Esta secuencia, PIAS2 as-LNA-GapmeR 2, tampoco tuvo ningún efecto anti-proliferativo a ninguna concentración testada (Fig IV.14-D).

Por *western blot* estudiamos en células T-UC1 la eficiencia de la secuencia PIAS2 as-LNA-GapmeR 2 reprimiendo la expresión de PIAS2 frente a nuestra secuencia transcrita *in vitro* PIAS2b dsRNAi 1. Cada secuencia anti-PIAS2 se comparó con su correspondiente secuencia control. El análisis cuantitativo de este western demostró la escasa disminución de proteína con PIAS2 as-LNA-GapmeR 2 frente a PIAS2b dsRNAi 1 (Fig IV.14-E).

Una vez determinado que PIAS2b dsRNAi 1 era la forma más eficiente de reprimir PIAS2b con un importante efecto funcional anti-proliferativo continuamos el resto de nuestros estudios con esta formulación.

#### ***IV.9 Mecanismo antiproliferativo de PIAS dsRNAi 1: muerte celular***

Nuestra siguiente pregunta fue cuál era el mecanismo por el que la represión de PIAS2 inhibía el crecimiento celular. Para estudiarlo realizamos estudios de citometría de flujo con células asincrónicas en células transfectadas con PIAS2b dsRNAi 1 frente a ns-dsRNAi.

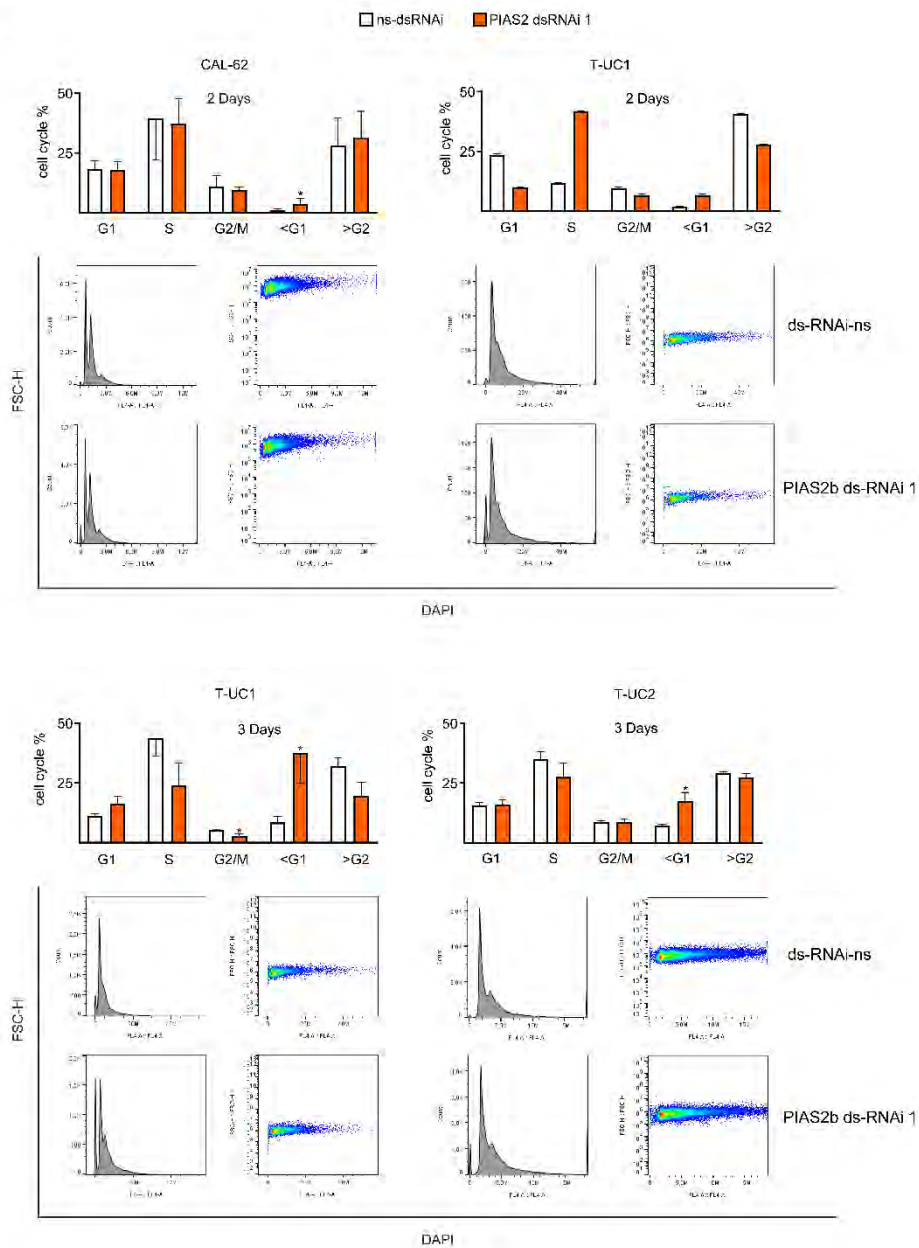
Observamos que ya al comienzo del efecto, antes de que hubiese diferencias significativas en ensayo de proliferación, empezaba a aumentar significativamente la fracción subG1 (Fig IV.15-A). La

intensidad a 2 días o 3 días variaba un poco entre cultivos y líneas dependiendo de su tasa de proliferación. En el cultivo T-UC1 comparamos 2 días y 3 días tras la transfección y observamos que con los días se acumula de forma significativa y progresivamente la fracción subG1. Este resultado indica que el tratamiento con PIAS2b dsRNAi 1 causa muerte celular.

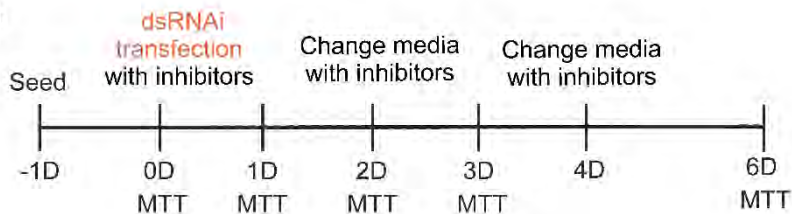
Nuestro siguiente experimento estuvo relacionado con la identificación del tipo de muerte que podría inducir la represión de PIAS2b. Las células de carcinoma anaplásico de tiroides podrían ser consideradas intuitivamente como resistentes a procesos de muerte.

En el año 2018 se adoptó una nomenclatura muy precisa para cada uno de los tipos de muerte celular con mecanismo molecular distintivo (Galluzzi et al, 2018). Basándonos en esto, estudiamos los grandes grupos de muerte celular programada (PCD): muerte dependiente de caspasas que incluye apoptosis intrínseca o extrínseca y anoikis pero también piroptosis y autofagia; y necroptosis o muerte dependiente de RIPK. Para ello utilizamos inhibidores de Caspasa 9 (CASP9) que es la caspasa formadora del apoptosoma iniciando la apoptosis (Galluzzi et al, 2018) y de Caspasa 3 (CASP3) que se considera una caspasa ejecutora más tardía (Galluzzi et al, 2018) pero que en receptores de dependencia es una caspasa inicial en la apoptosis particularmente en células endocrinas (Raveh et al, 2001; Bordeaux et al, 2002; Liu et al, 2002; Cañibano et al, 2007; Zhu et al, 2013; Mehlen et al, 2014). Y el inhibidor de RIPK, Necrostatin 1 (Takahashi et al, 2012).

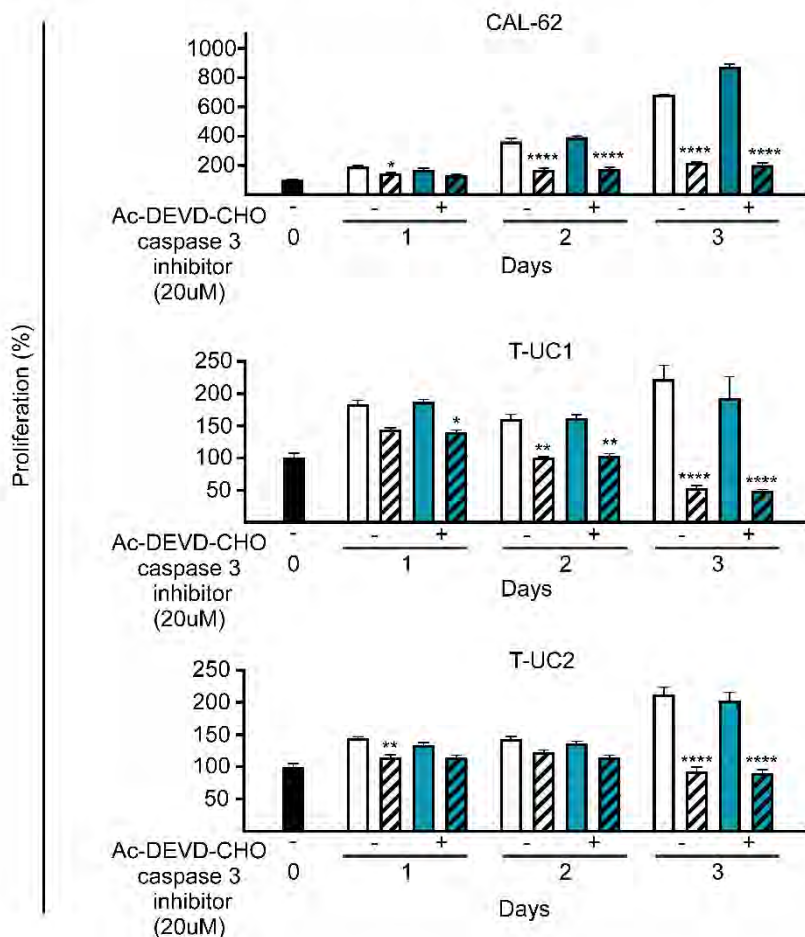
A

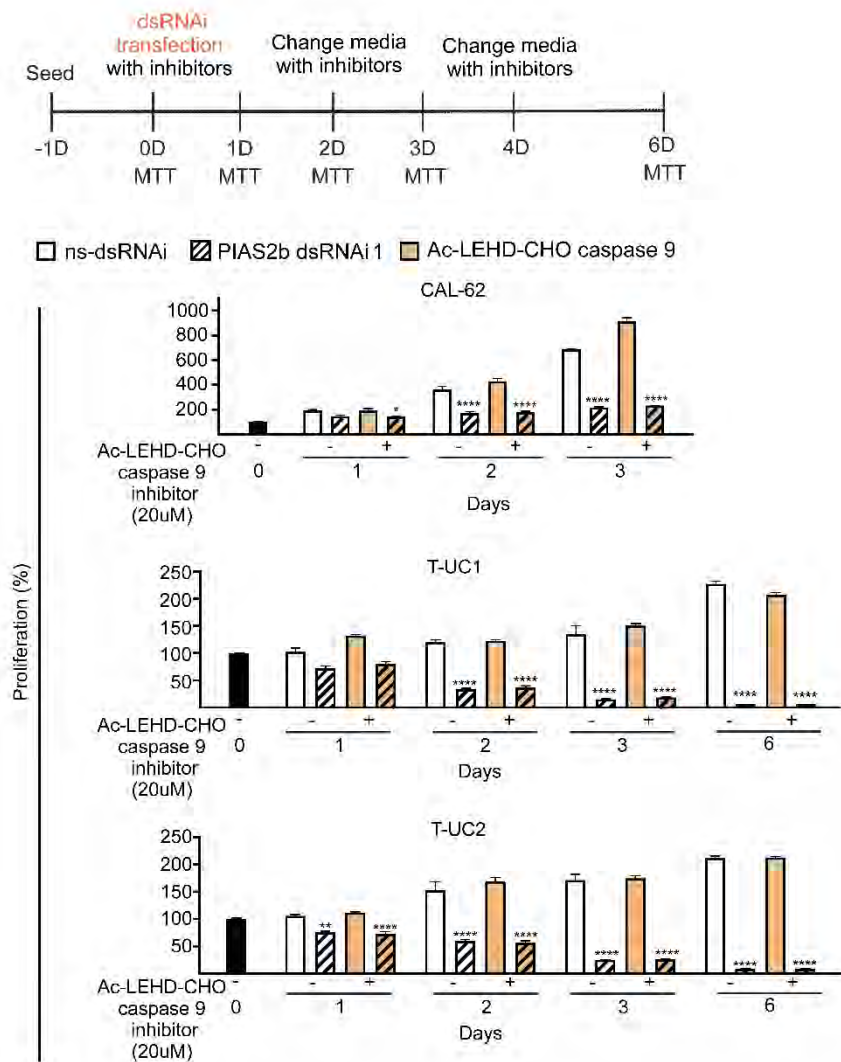


B

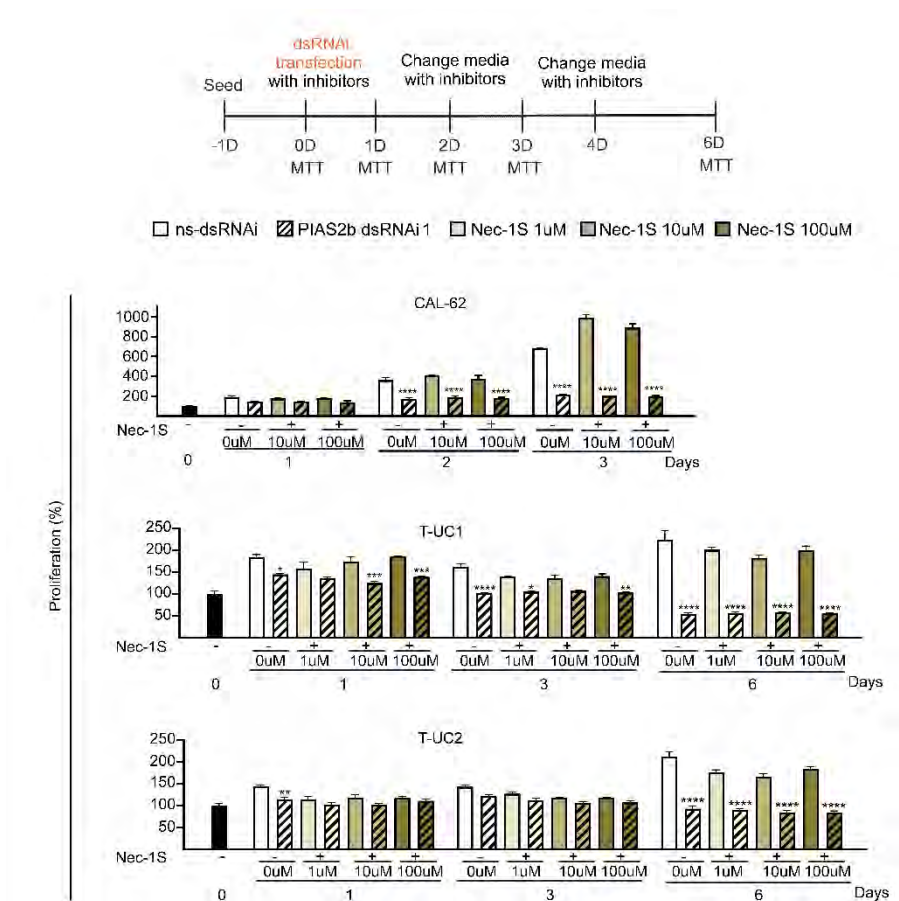


□ ns-dsRNAi    ▨ PIAS2b dsRNAi 1    ■ Ac-DEVD-CHO caspase 3









**Figura IV.15. PIAS2b dsRNAi 1 induce muerte celular que no es por apoptosis, piroptosis, autofagia o necroptosis. A)** Estudio de ciclo celular por citometría de flujo en células transfectadas con ns-dsRNAi (blanco) o PIAS2b dsRNAi 1 (naranja) en cultivos primarios T-UC1 y T-UC2 y la línea celular CAL-62. **B)** Tratamiento con inhibidores de caspasa 3 (azul), caspasa 9 (naranja) y RIPK1 a dos concentraciones (marrón) en las mismas células que en A.

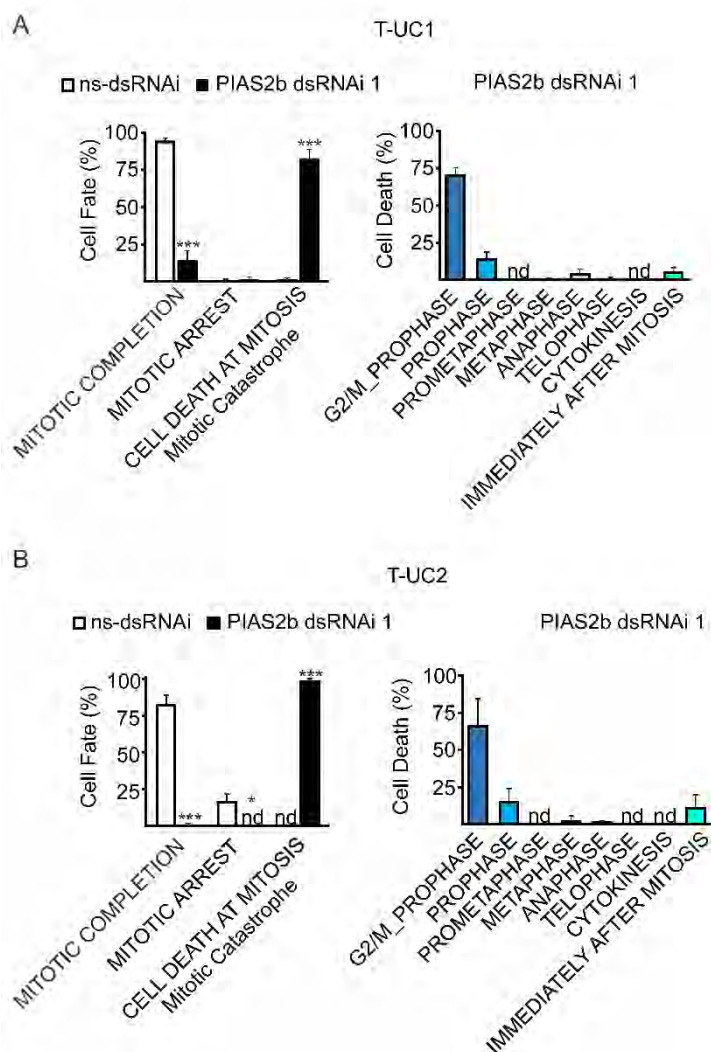
(A: Media±SEM de n=3. Mann-Whitney; B: Media±SEM de un n=3 con 3 replicados por condición en cada experimento. ANOVA de medidas repetidas. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001).

Nuestro grupo ya tenía experiencia previa con inhibidores de CASP3, Ac-DEVD, y CASP9, Ac-LEHD, en células de tiroides normal y de carcinoma diferenciado (Garcia-Rendueles et al, 2017), y en general en células endocrinas (Cañibano et al, 2007), y sabíamos la concentración máxima de esos péptidos inhibidores en líneas celulares y cultivos primarios. El rango de concentraciones efectivas a testar en cada célula del inhibidor específico de RIPK1, Necrostatin-1, también eran conocidas (Takahashi et al, 2012).

Los inhibidores de caspasas no alteraron el crecimiento de las células transfectadas con ns-dsRNAi (Fig IV.15-B). Ninguno de estos inhibidores de caspasas, a ninguna de las concentraciones testadas, alteró el efecto anti-proliferativo de PIAS2b dsRNAi 1, que siguió su curso a lo largo de los días tras la transfección (Fig IV.15-B). Se compararon CAL-62, T-UC1 y T-UC2 con el mismo resultado negativo. Esto sumado a un experimento de tinción con Hoescht 33258 para detectar células apoptóticas condensadas cuyo resultado fue absolutamente negativo, sin encontrar ningún porcentaje destacable de células condensadas en ningún tratamiento (datos no mostrados), descartó muerte por apoptosis.

El tratamiento con Necrostatin-1 no alteró el crecimiento de células transfectadas con ns-dsRNAi, aunque se ven mínimas diferencias en los cultivos primarios a largo plazo. Asimismo, ninguna concentración de Necrostatin-1 alteró el efecto anti-proliferativo de PIAS2b dsRNAi (Fig IV.15-B). Esto descarta también la muerte por Necroptosis.



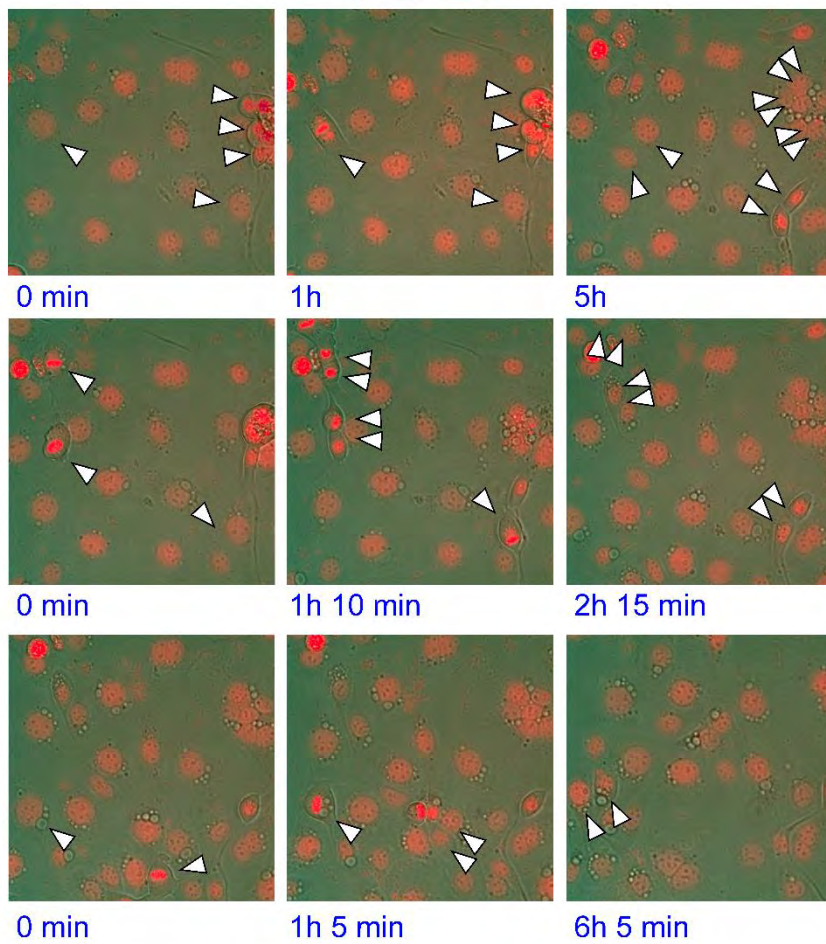


**Figura IV.16. PIAS2b dsRNAi induce catástrofe mitótica en cultivos primarios de cáncer anaplásico de tiroides.** Experimentos de registro con video time-lapse de células de cultivos anaplásicos T-UC1 y T-UC2 de células un día después de ser transfectadas con ns-dsRNAi o PIAS2b dsRNAi 1. Las células se registraron durante tres días tras adición de SiR-DNA. **A-B)** Cuantificación de todas las células teñidas seguidas durante el experimento completo en T-UC1 (**A**) y T-UC2 (**B**) según su destino (*Cell fate*). Para las que mueren en mitosis (*Mitotic Catastrophe*) se especifica en qué fase lo hacen. **C-D)** Campos significativos del cultivo T-UC1 (**C**) y T-UC2 (**D**) donde se señalan mitosis completas (flechas blancas) o muerte en las distintas fases de mitosis (escala de azules). (A: Media±SEM de un n=200 células en mitosis. Mann-Whitney; B: T-test. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001).

C

T-UC1

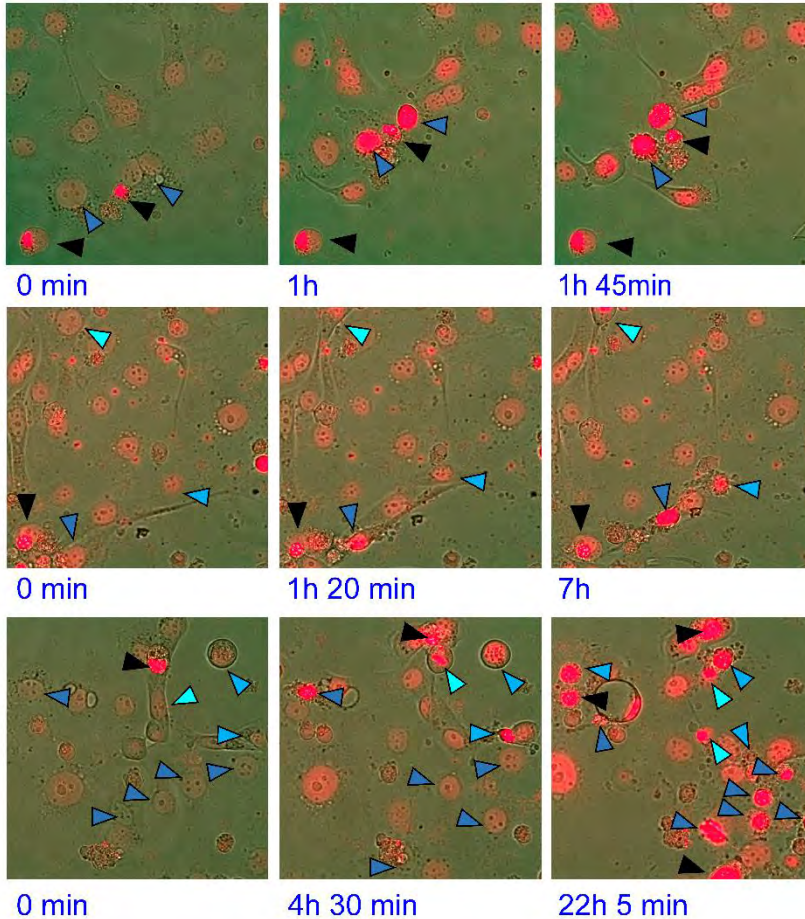
ns-dsRNAi



△ Mitotic Completion

## T-UC1

### PIAS2b dsRNAi 1



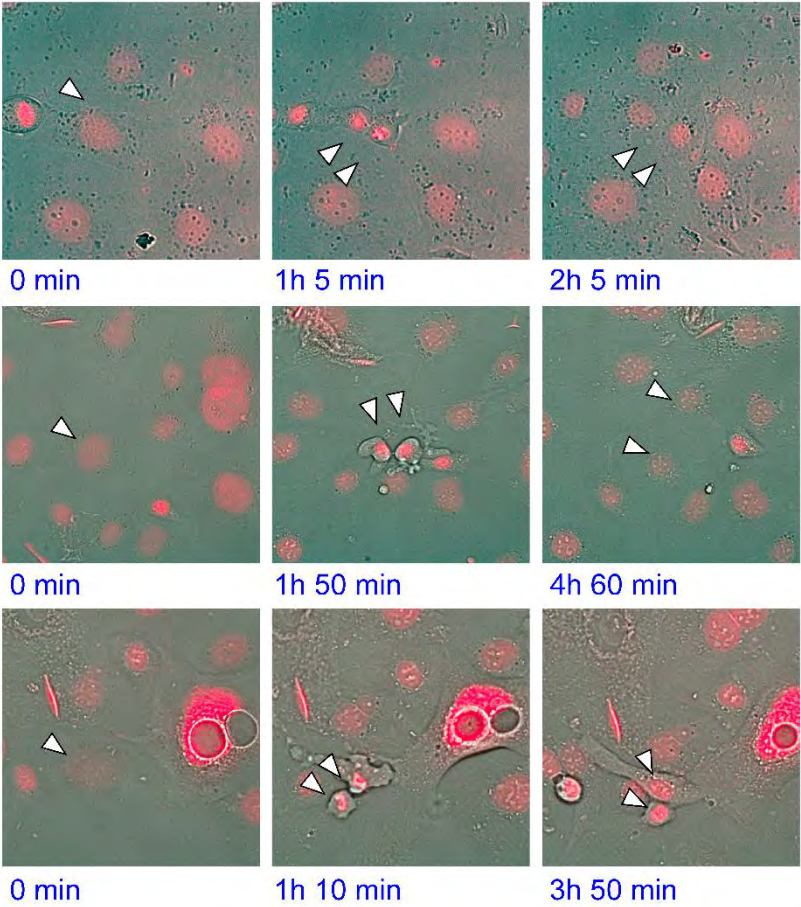
### Mitotic Catastrophe

- ▲ at G2/M-Prophase
- ▲ at Prophase
- ▲ immediately after Mitosis
- ▲ condensed cells dead at mitosis

D

T-UC2

ns-dsRNAi

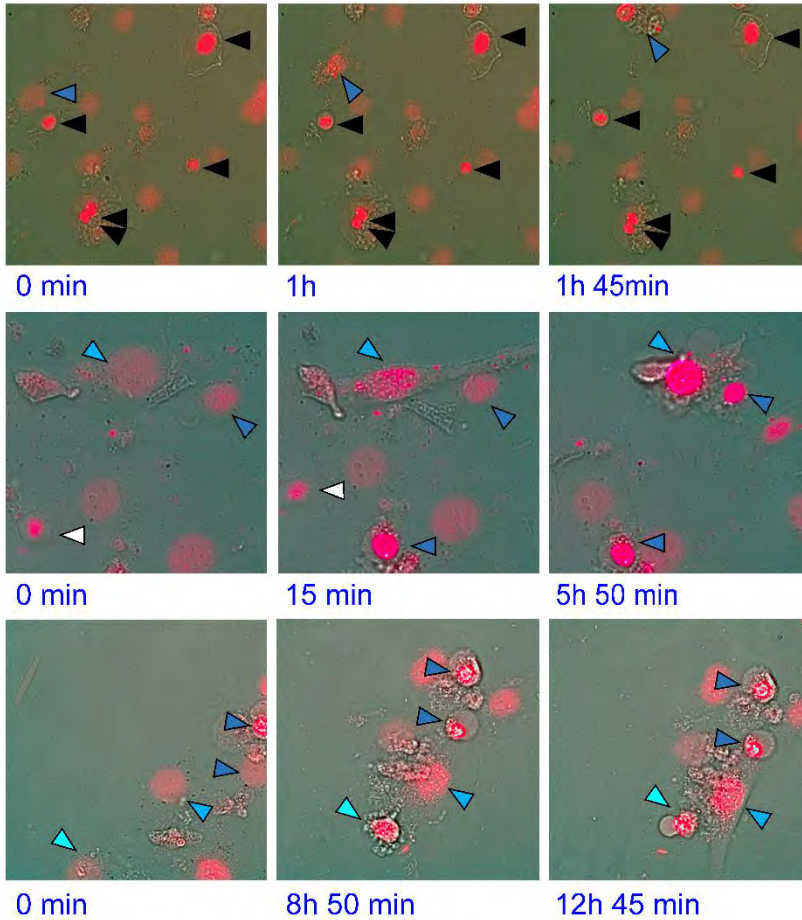


Δ Mitotic Completion



## T-UC2

### PIAS2b dsRNAi 1



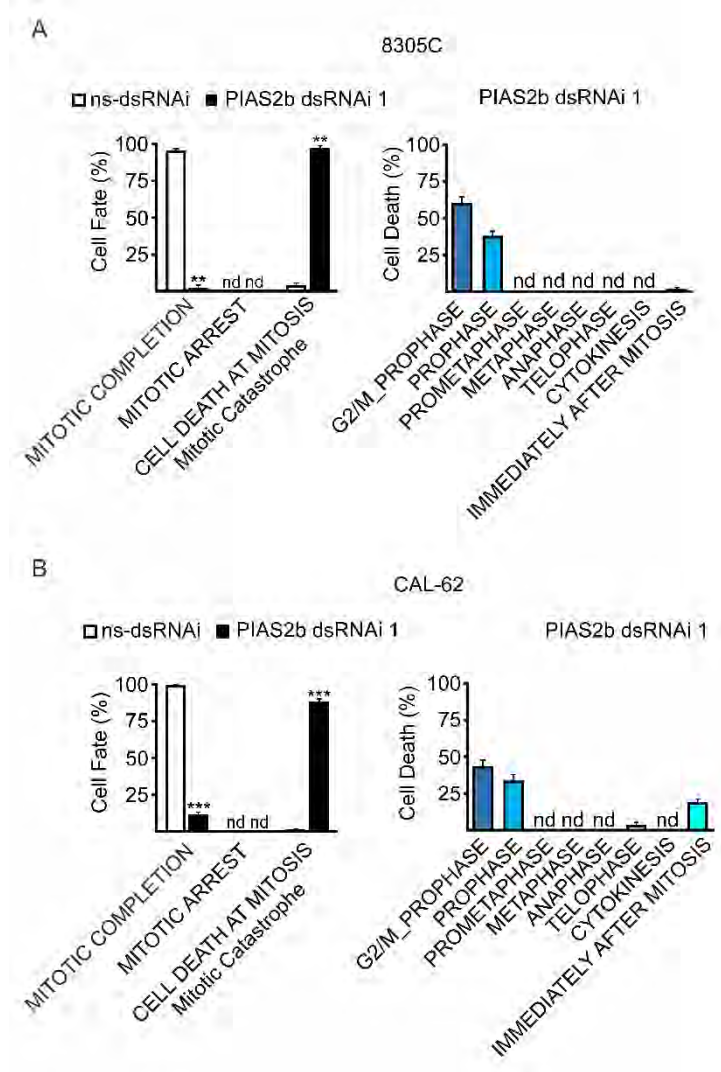
### Mitotic Catastrophe

- ▲ at G2/M-Prophase
- ▲ at Prophase
- ▲ immediately after Mitosis
- ▲ condensed cells dead at mitosis

Decidimos entonces hacer experimentos de video time-lapse en células marcadas con SiR-DNA, un marcador fluorescente de unión específica a DNA que emite en longitud de onda rojo lejano y permite hacer experimentos a largo plazo sin que las células mueran por acumulación de oxidación tras la excitación con el láser (Lukinavicius et al, 2015).

Células asincrónicas de cultivo primario T-UC1, T-UC2 y líneas celulares 8305C y CAL-62 fueron transfectadas con ns-dsRNAi o PIAS2b dsRNAi 1 durante 24 horas, lavadas e incubadas por un día y registradas a partir de ese momento y durante tres días (día 3 desde siembra, dos días tras la transfección, tres días de video time-lapse). En las Figuras IV.16-A-B y IV.17-A-B se muestran los datos y los contejes de todas las fases de mitosis. Las células tratadas con ns-dsRNAi se dividen de forma completa y asidua (*Mitotic Completion*), más rápido las T-UC1, más lentas las T-UC2 (Fig IV.16-C-D, izquierda), y por supuesto mucho más rápidas las líneas celulares (Fig IV.17-C-D, izquierda). Sin embargo, las células tratadas con PIAS2b dsRNAi 1 mueren casi todas en alguna de las fases de la mitosis, (Fig IV.16-C-D y IV.17-C-D, derecha). El análisis cuantitativo de esos datos es contundente en la conclusión de que PIAS2b dsRNAi induce “catástrofe mitótica”.

En los cultivos primarios, la mayoría de las células quedan paradas y mueren al inicio de la mitosis (G2/M-Profase) (Fig IV.16-A-B). Un segundo grupo menos numeroso inicia la mitosis y muere ya en Profase. Por último, un grupo pequeño consigue acabar la mitosis y muere al final. Los datos son similares en los dos cultivos. En las líneas celulares, hay un número equivalente de células que mueren al entrar en mitosis como el que muere ya dentro de la profase (Fig IV.17-A-B). Y un pequeño porcentaje que muere tras acabar la mitosis.



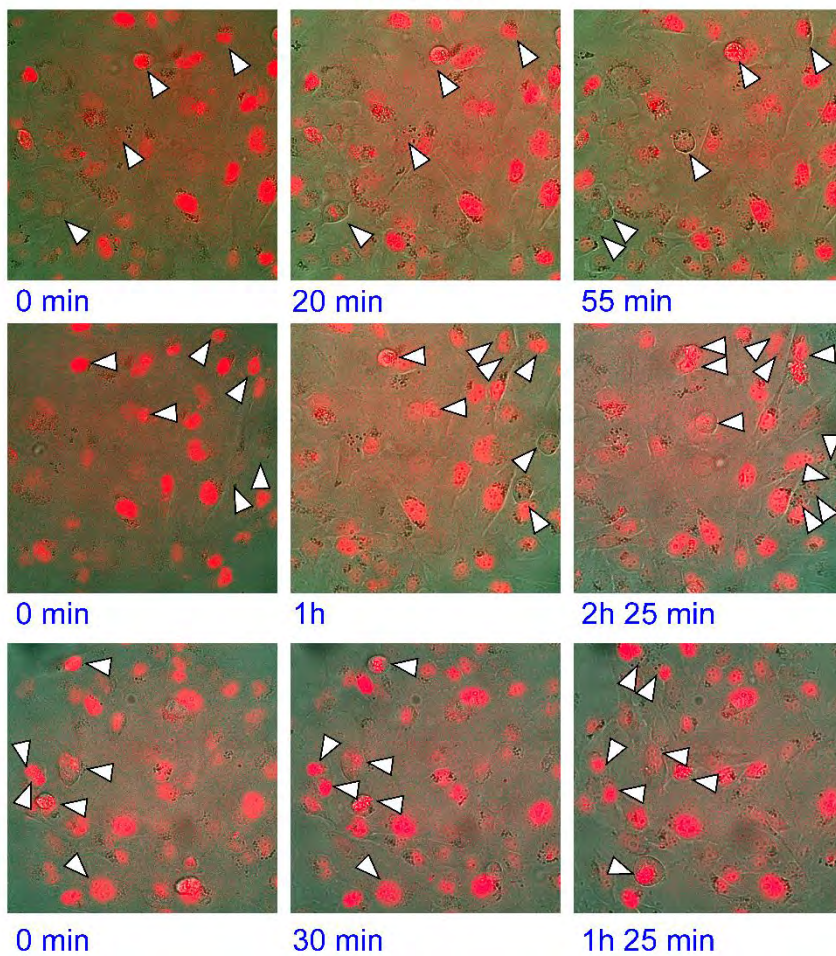
**Figura IV.17. PIAS2b dsRNAi induce catástrofe mitótica en líneas celulares de cáncer anaplásico de tiroides.** Experimentos de registro con video *time-lapse* de células de las líneas anaplásicas 8305C y CAL-62 un día después de ser transfectadas con ns-dsRNAi o PIAS2b dsRNAi 1. Las células se registraron durante tres días tras adición de SiR-DNA. A-B) Cuantificación de todas las células teñidas seguidas durante el experimento completo en 8305C (A) y CAL-62 (B) según su destino (*Cell fate*). Para las que mueren en mitosis (*Mitotic Catastrophe*) se especifica en qué fase lo hacen. C-D) Campos significativos de la línea 8305C (C) y CAL-62 (D) donde se señalan mitosis completas (flechas blancas) o muerte en las distintas fases de mitosis (escala de azules).

(A-B: Media±SEM de un n=200 células en mitosis. Mann-Whitney. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001).

C

8305C

ns-dsRNAi

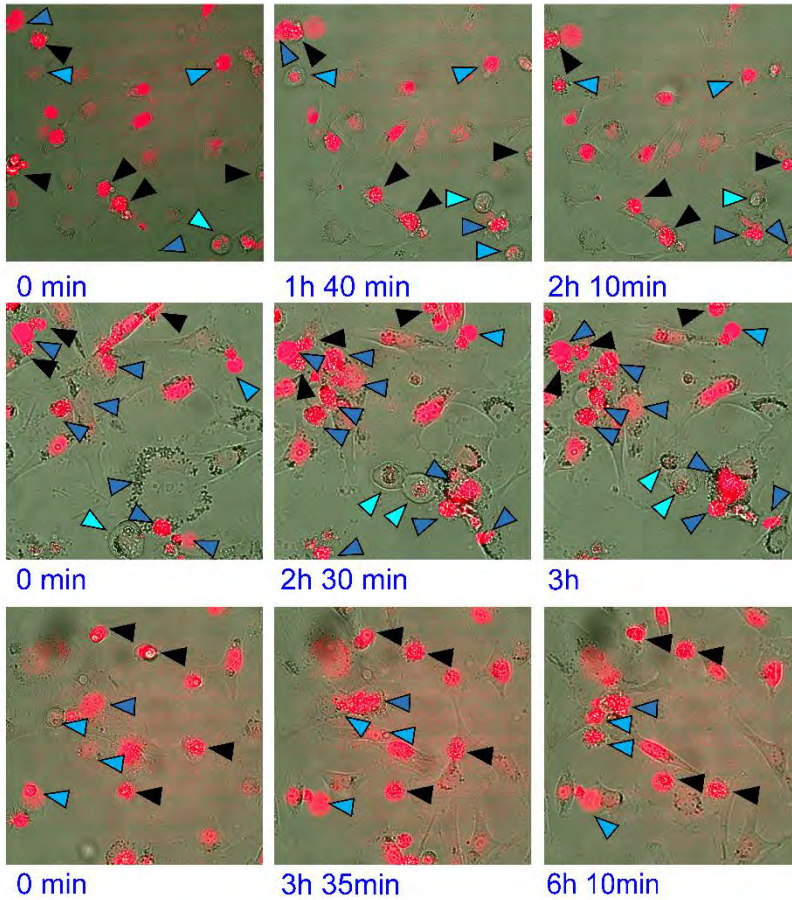


△ Mitotic Completion



8305C

PIAS2b dsRNAi 1



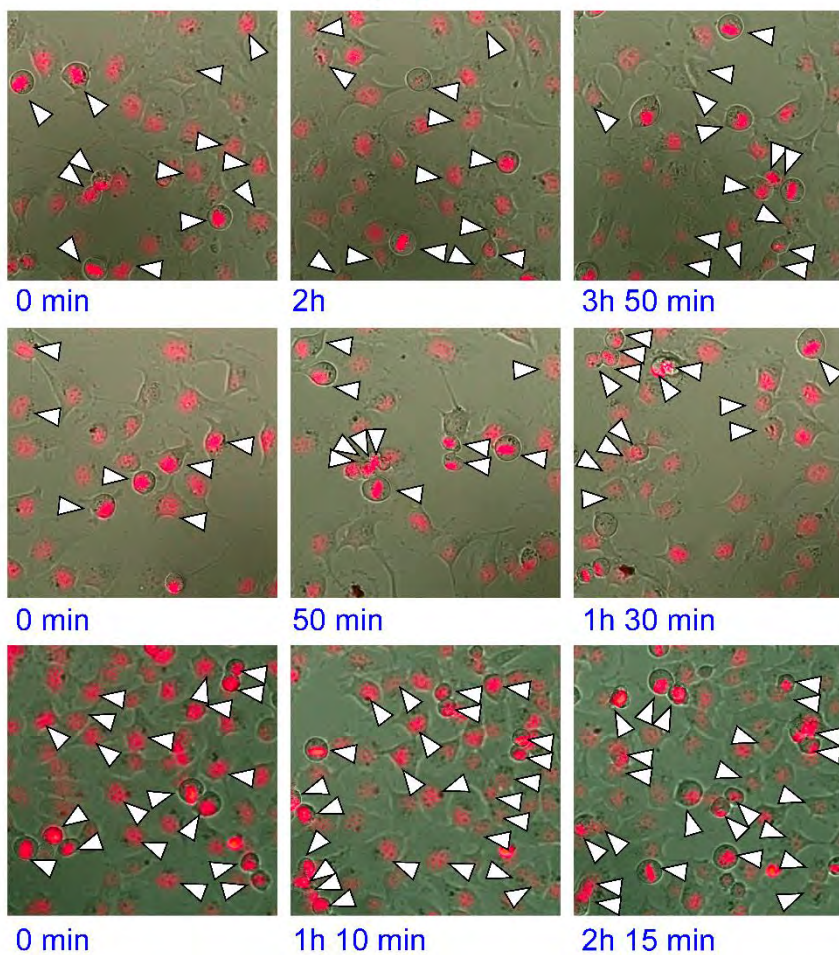
Mitotic Catastrophe

- ▲ at G2/M-Prophase
- ▲ at Prophase
- ▲ immediately after Mitosis
- ▲ condensed cells dead at mitosis

D

CAL-62

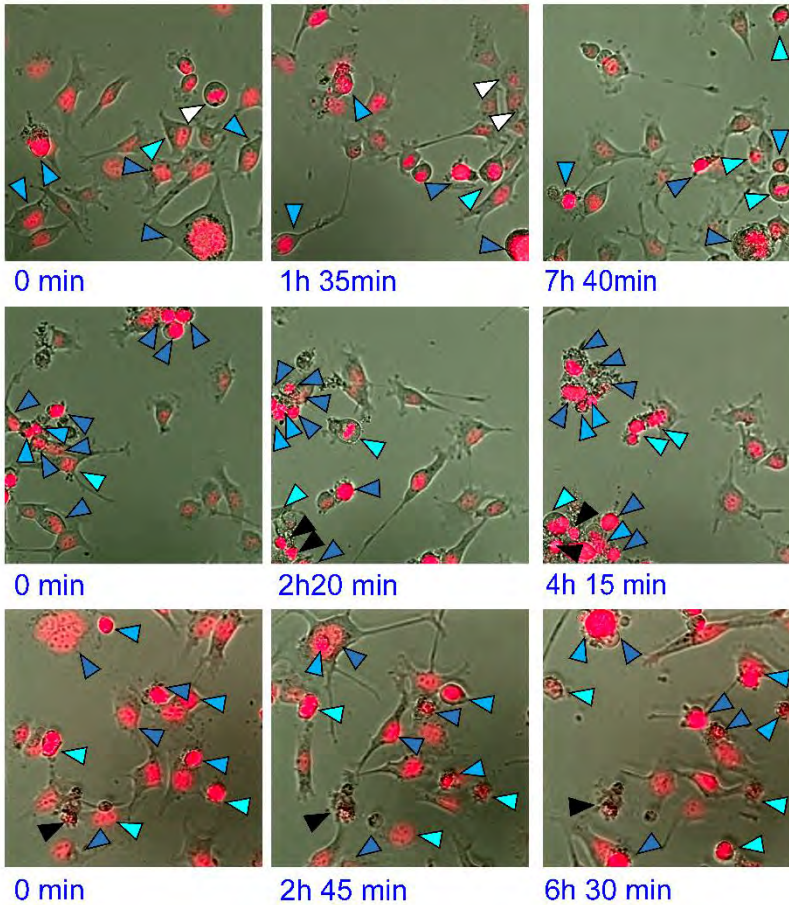
ns-dsRNAi



△ Mitotic Completion

## CAL-62

### PIAS2b dsRNAi 1



### Mitotic Catastrophe

▲ at G2/M-Prophase

▲ at Prophase

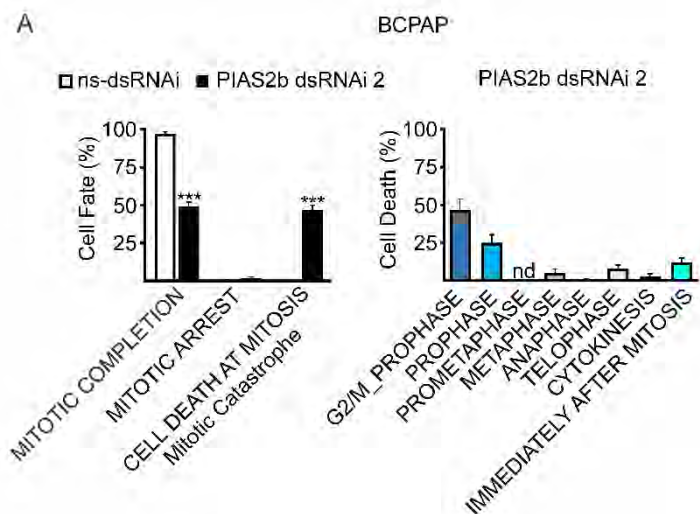
▲ immediately after Mitosis

▲ condensed cells dead at mitosis

Un resultado un poco menos eficiente se obtuvo en la línea de carcinoma de tiroides pobremente diferenciado BCPAP (Fig IV.18), sólo que aquí transfectando PIAS2 dsRNAi 2 que era el que se había visto más efectivo en los experimentos de conteo celular (ver Fig IV.7). PIAS2b dsRNAi 2 conseguía parar matar en mitosis a la mitad de las células aproximadamente, mientras que el resto conseguía completar la mitosis (Fig IV.18-A-B). Un pequeñísimo porcentaje quedaban paradas en mitosis. De las que entraban en catástrofe mitótica, la mayoría lo hacía justo al principio o en la primera fase de mitosis, la profase, y sólo un pequeño porcentaje lo hacía justo después de terminar la mitosis (Fig IV.18-A derecha). Vemos entonces que los mecanismos de acción anticancerosa de PIAS2 dsRNAi se mantienen en estos dos orígenes celulares pero que lo que varía principalmente es la eficiencia con lo que hace dicha acción.





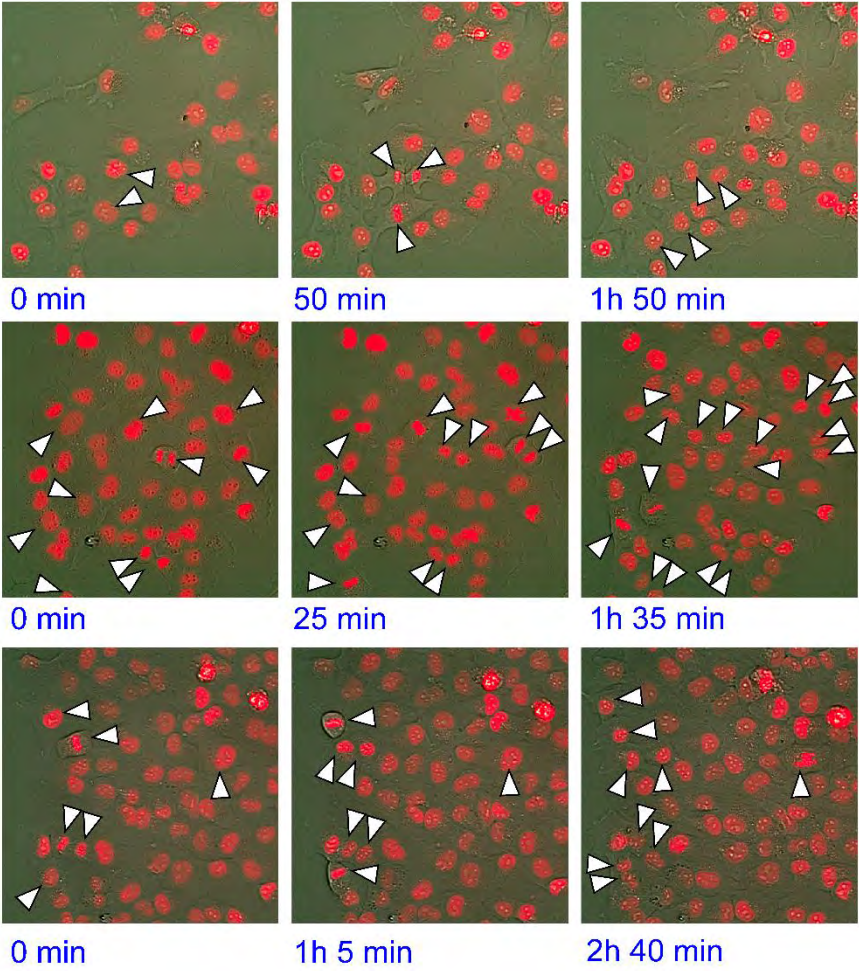


**Figura IV.18. PIAS2b dsRNAi induce catástrofe mitótica en la línea celular de cáncer de tiroides pobremente diferenciado BCPAP.** Experimentos de registro con video *time-lapse* de células de la línea BCPAP un día después de ser transfectadas con ns-dsRNAi o PIAS2b dsRNAi 2. Las células se registraron durante tres días tras adición del fluorocromo marcador SiR-DNA. **A)** Cuantificación de todas las células teñidas seguidas durante el experimento completo según su destino (*Cell fate*). Para las que mueren en mitosis (*Mitotic Catastrophe*) se especifica en qué fase lo hacen. **B)** Campos significativos donde se señalan mitosis completas (flechas blancas), muerte en las distintas fases de mitosis (escala de azules) o parada en mitosis (flechas naranjas). (A: Media±SEM de un n=200 células en mitosis. Mann-Whitney. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001).

B

BCPAP

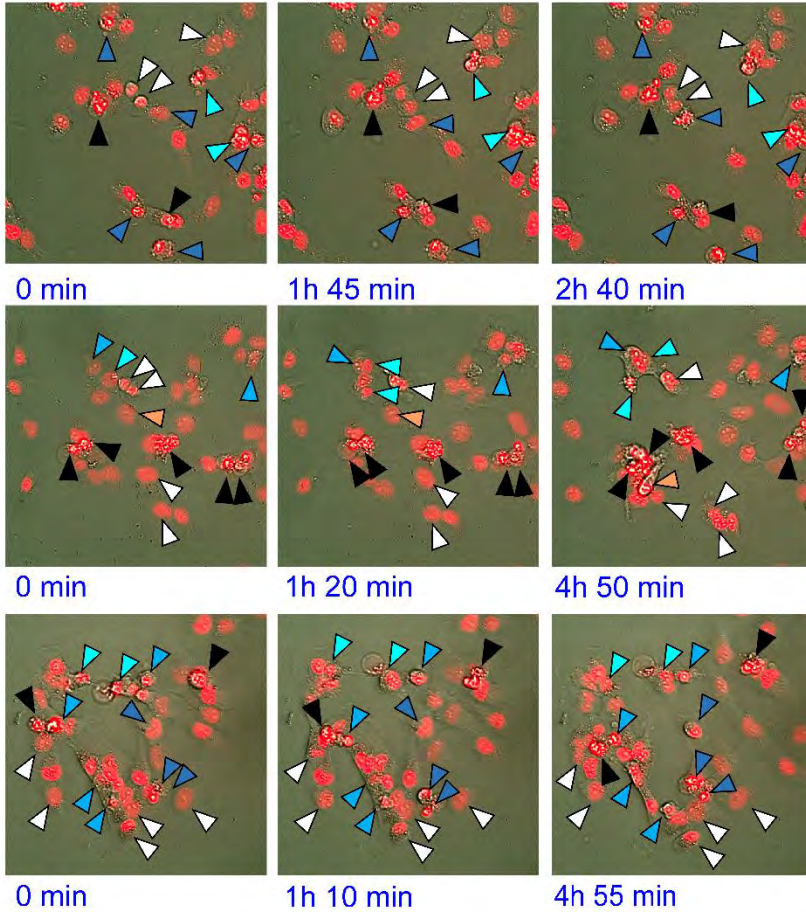
ns-dsRNAi



△ Mitotic Completion

# BCPAP

## PIAS2b dsRNAi 2



### Mitotic Catastrophe

▲ Mitotic Arrest

▲ at G2/M-Prophase

▲ at Prophase

▲ immediately after Mitosis

▲ condensed cells dead at mitosis

#### ***IV.10 PIAS2 se acumula en mitosis y participa en el huso mitótico***

Los datos anteriores sugieren que PIAS2 tuviese algún papel importante en mitosis. Sin embargo, para que esto sea así debería concentrarse en mitosis como se conoce para muchas de las proteínas que participan en mitosis.

Para explorar esta hipótesis necesitábamos sincronizar a las células en mitosis. Las células anaplásicas de cáncer de tiroides se dividen muy rápido, mucho más rápido que las células normales. No es fácil pensar que las células anaplásicas vayan a seguir el comportamiento habitual a la hora de ser sincronizadas en una fase del ciclo celular, ya que ni siquiera se conoce bien cuantas horas le dedican a cada fase durante su ciclo celular. Como nuestro objetivo era estudiar lo que sucedía alrededor de la entrada y progresión en mitosis, queríamos sincronizarlas antes de mitosis, y no durante con algún tóxico que bloquee la mitosis. El método más utilizado de sincronización fuera de mitosis es el doble bloqueo con Timidina (DT) que en células normales las sincroniza en la fase S seguido o no de Nocodazol que las sincroniza en mitosis (Bostock et al, 1971; Rodrigue et al, 2013). La Timidina convertida en dTTP es un inhibidor alostérico de la enzima ribonucleótido reductasa, lo cual deplecciona a la célula de otro desoxirribonucleótido, el dCTP y paraliza la síntesis de DNA. (Bjursell and Reichard 1973; Eriksson et al, 1979; Jordan and Reichard, 1998). El doble bloqueo está separado por una fase de lavado o “release” donde la célula completa un primer ciclo y comienza un segundo donde vuelve a ser inhibida por una segunda incubación con Timidina, lo que ayuda a conseguir una mejor sincronización (Ma and Poon, 2016). Nosotros sólo queríamos enriquecer en mitosis sin alterar el funcionamiento y mitosis de la célula para localizar si PIAS2 aumentaba o desaparecía en mitosis, o si se localizaba en alguna parte en concreto de la célula durante mitosis. Por tanto, realizamos DT, sin Nocodazol, y seguimos por citometría tras el lavado (*Release*) hasta obtener el pico de mitosis. El seguimiento por citometría demostró que, en nuestras células anaplásicas la sincronización tras el doble bloqueo con Timidina se obtenía en Fase S tardía o S/G2, ya que 6 horas después del *Release* las células entraban en mitosis (Fig IV.19).



Inmediatamente tras el bloqueo con DT (0h) las células se acumulan parcialmente en G1 y no hay fase S (que está bloqueada con el exceso de Timidina) (Fig IV.19-A). Sólo 6 horas después la mayor parte de las células están en G2/M, y 12 horas después ya se recupera el ciclo normal cercano al asincrónico (Fig IV.19-A). A este tipo de sincronización le llamaremos a partir de ahora DT+6h *release*.

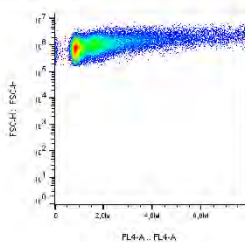
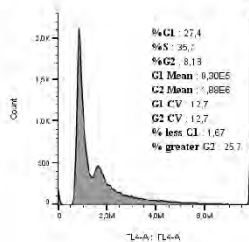
Realizamos experimentos de *western blot* para medir la expresión de PIAS2. La proteína PIAS2, medida tanto por mPIAS2 como por rPIAS2, al igual que les pasa a proteínas como Aurora Kinasa (AURKA) o Tubulina gamma (gTubulin) se acumula en mitosis tras DT en células 8305C (Fig IV.19-B). Repitiendo el mismo *time-course* en células CAL-62 obtuvimos el mismo resultado (Fig IV.19-B derecha). Pasamos entonces a realizar inmunofluorescencias dobles con proteínas de mitosis y anticuerpos anti-PIAS2. rPIAS2 localizaba en los núcleos como ya sabíamos sin ninguna característica especial en las células en mitosis señaladas con gTubulin, excepto que rellenaba toda la célula (Fig IV.19-C arriba).

mPIAS2 colocalizaba con gTubulin en una célula en metafase, y colocalizaba con el centrosoma en células al inicio de la Profase, indicada por centrosomas duplicados en la tinción con gTubulin (Fig IV.19-C abajo). La tinción era tan intensa en las células de mitosis que se saturaba la señal si se quería ver las células en interfase, y por eso casi no se observan en estas microfotografías.

A

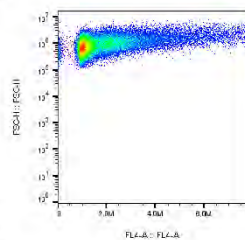
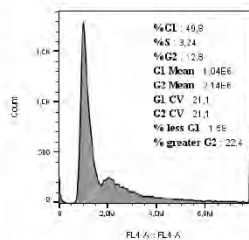
8305C

Asynchronous

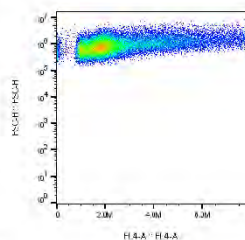
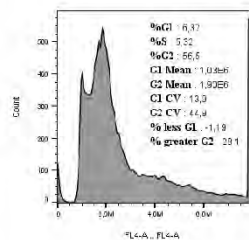


Release Double Thymidine (DT)

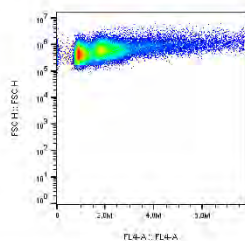
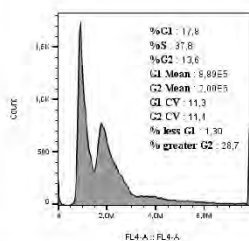
0h



6h

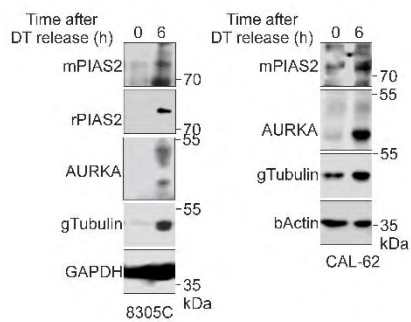


12h

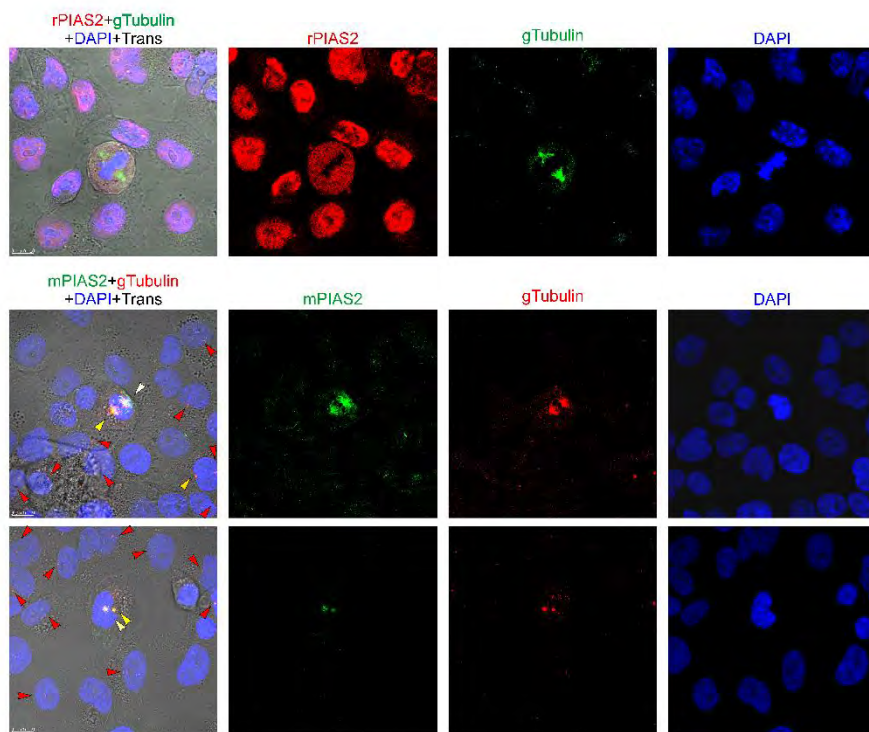


DAPI

B



C

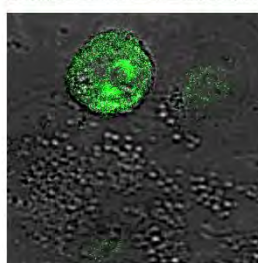
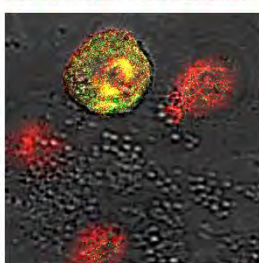
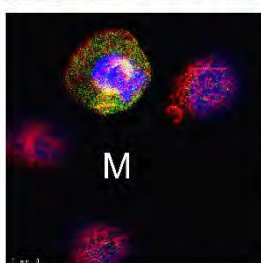
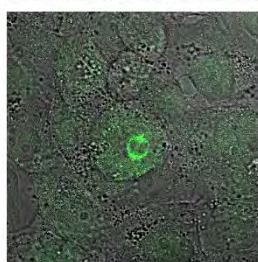
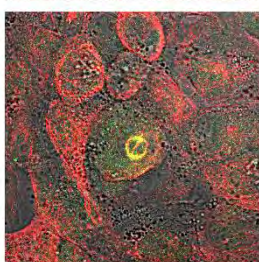
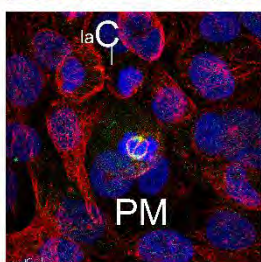
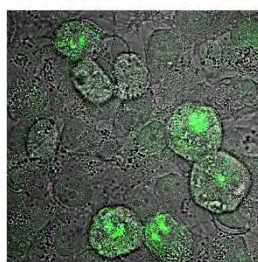
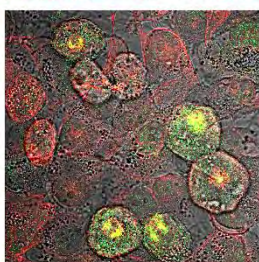
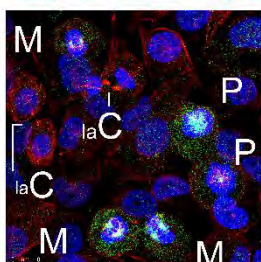
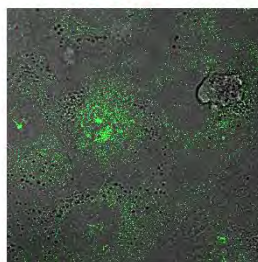
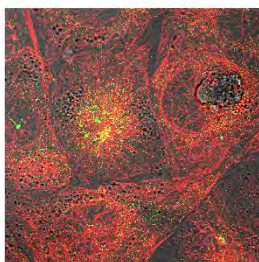
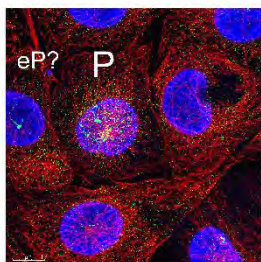


D

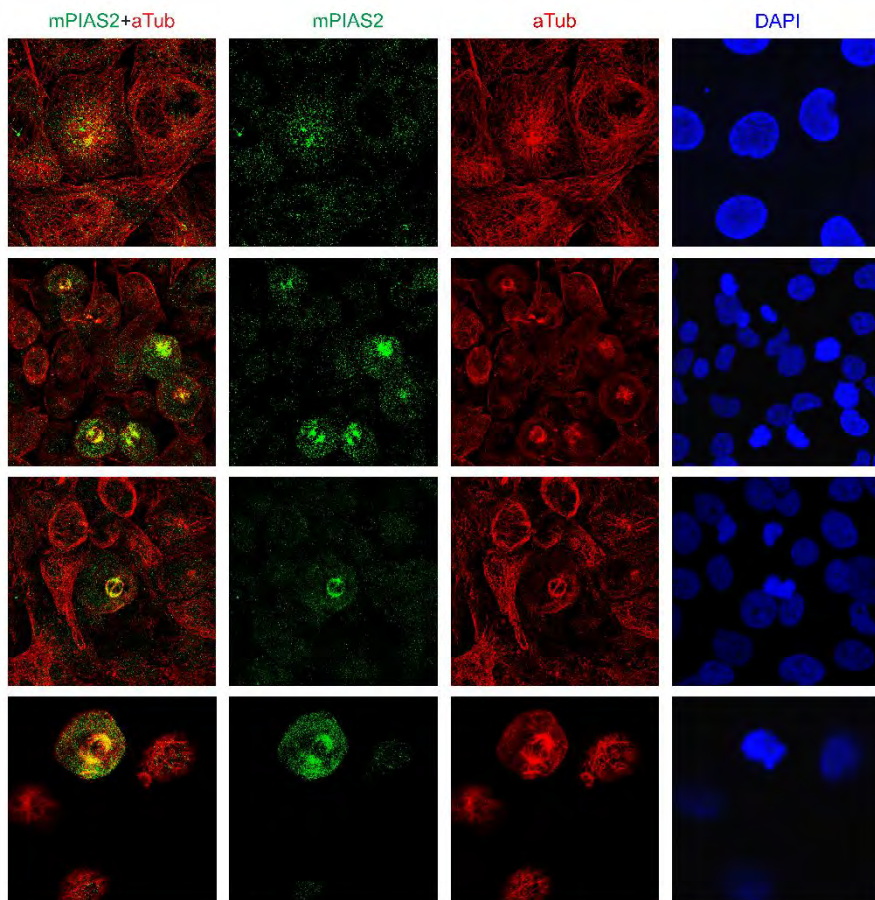
mPIAS2+aTubulin  
+DAPI

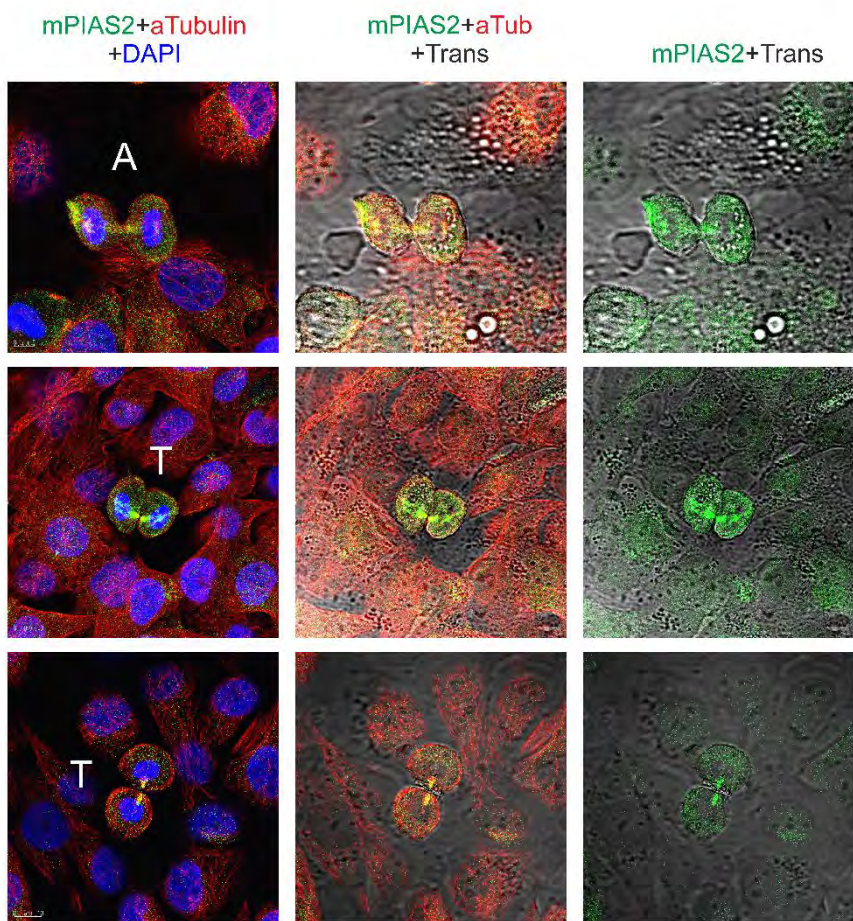
mPIAS2+aTub  
+Trans

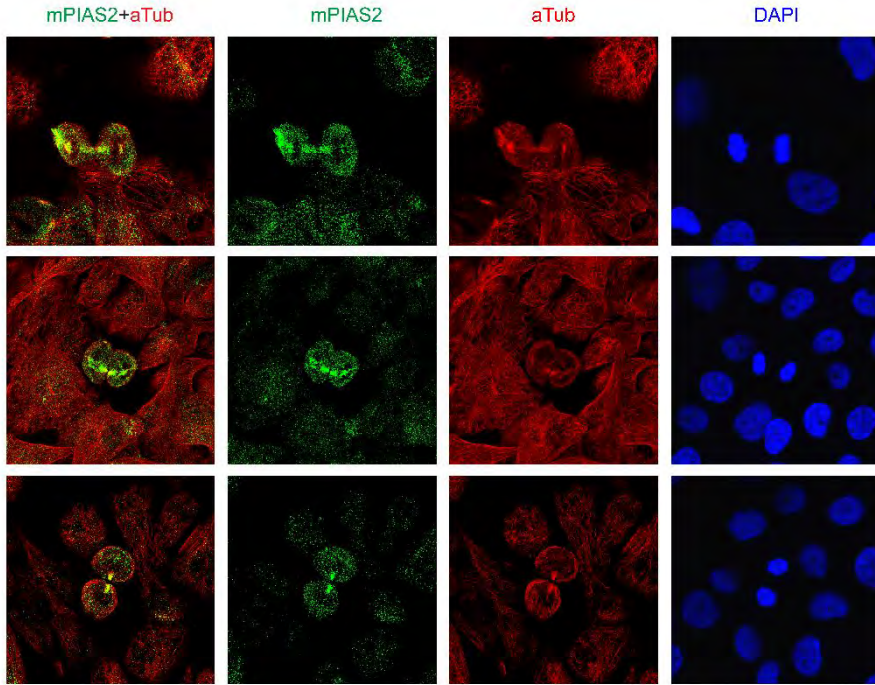
mPIAS2+Trans











**Figura IV.19. Localización de PIAS2 en el huso mitótico.** A) Sincronización de las células 8305C en mitosis mediante doble bloqueo con Timidina (DT), lavado y *time-course* posterior (*release*). B) *Western blot* para mPIAS2, rPIAS2, proteínas de mitosis gTubulin, AURKA y controles -beta-Actin o GAPDH- comparando en paralelo 8305C y CAL-62. C) Doble inmunofluorescencia en células 8305C comparando rPIAS2 (rojo) y gTubulin (verde), con mPIAS2 (verde) y gTubulin (rojo). Flechas amarillas: célula con colocalización. Flechas rojas: centrosoma/s delineados por la gTubulin. DAPI en azul. D) Doble inmunofluorescencia para mPIAS2 (verde) y aTubulin (rojo) enfocando en células 8305C todas las fases de la mitosis a partir de su tinción con DAPI. Amarillo= color de colocalización entre mPIAS2 y aTub. eP= Profase temprana; P=Profase; PM= Prometafase; M=Metafase; T=Telofase; laC= Citoquinesis tardía.



Nuestro siguiente paso fue entonces buscar todas las fases de la mitosis mediante tinción con la proteína fundamental del huso mitótico, Tubulin alfa ( $\alpha$ Tubulin), y estudiar si PIAS2, medida por tinción con mPIAS2, localizaba en el huso. Como se puede observar en la Fig IV.19-D, PIAS2 aparecía colocalizado con Tubulin en Profase (P), Prometáfase (PM) y Metafase (M) de forma muy intensa, ya que había sumación de pseudocolores en el confocal dando color amarillo. También seguía co-localizando en Anafase (A) y Telofase (T). Dejaba de colocalizar al final de la Citoquinesis (*late Cytokinesis*, laC) cuando prácticamente ya no había uso mitótico. Al principio de la Profase (*early Prophase*, eP) cuando todavía no había uso mitótico organizado, ya se veía acumulación de PIAS2, detectado con mPIAS2 (Fig IV.19-D arriba).

#### ***IV.11 PIAS2 se une a AURKA y a Tubulina gamma***

Una vez que nos aseguramos que PIAS2 detectada con mPIAS2 claramente era una proteína de mitosis en células anaplásicas decidimos indagar más profundamente qué proteínas podrían estar uniendo PIAS2 durante la mitosis de estas células. En extractos sincronizados con DT+6 h *release*, inmunoprecipitamos con mPIAS2 o alternativamente con la misma cantidad de inmunoglobulina del mismo isotipo y origen animal (mIgG2a) (Fig IV.20A). Estos inmunoprecipitados se analizaron mediante proteómica global. Los espectros MS/MS se enfrentaron contra la base de datos Uniprot\_ FASTA (Uniprot, 2019; version 03/2019, HUMAN 20303 proteins) usando el software ProteinPilot software (version 5.0.2.0, revision 5346, de Applied Biosystems). La identificación de proteínas mediante el algoritmo Paragon (versión 5.0.2.0, revisión 5174) fue evaluada posteriormente por el software Protein Pilot. La media, desviación estándar y los valores de p para estimar la significación estadística por cada una de las proteínas identificadas en cada uno de los experimentos también fueron calculados por ProteinPilot. El ajuste por exceso de comparaciones (*Global False Discovery Rate*, FDR) lo calcula el programa mediante la fórmula:  $FDR = (2 \times \text{reverse}) / (\text{forward} + \text{reverse})$ . Los criterios de aceptación para aceptar a una proteína como identificada para los

análisis estadísticos posteriores fueron: *Unused ProtScore* >1.3 (medida de si sus espectros son únicos o pueden corresponder a otras proteínas) con al menos un péptido identificado con >95% de confianza, y *Global FDR* <1%, 92,6% *Confidence*. Estos criterios son usados habitualmente en los análisis de proteómica global (Xiao et al, 2010).

A las proteínas identificadas se les restó las proteínas que aparecían en el control de IgG2a. Se evaluaron las proteínas significativamente identificadas y repetidas en tres experimentos independientes. En total se identificaron 2.322 proteínas, pero sólo 1.985 cumplieron con los criterios designados (ver Apéndice 1). Las proteínas se analizaron en el Reactome v68 (Fabregat et al, 2018; <https://reactome.org/>) *pathways*, para analizar las vías celulares redundantes de forma significativa. Como se observa en la Fig IV.20-B, una de las *pathways* destacadas es la de proteínas de mitosis, que se representan en forma de STRING v11 (Szklarczyk et al, 2015; <https://string-db.org/>) (Fig IV.20-C).

Nuestros datos hasta este momento indicaban que PIAS2 se localizaba en mitosis, pero que colocalizaba con Tubulina gamma en los centrosomas al menos desde el inicio de la mitosis. Por otra parte, está descrito que PIAS2 es una SUMO ligasa. En la Tabla IV.15 se muestran las proteínas de los tres grupos principales: las relacionadas con mitosis, las relacionadas con SUMO y las relacionadas con centrosomas. Observamos que algunas proteínas se repiten en al menos dos columnas, aunque se debe tener en cuenta que en Reactome v68 (Fabregat et al, 2018; <https://reactome.org/>) la relación con el tópico de búsqueda puede ser un poco distante.

Tabla IV.15. Proteínas identificadas en proteómica global de los grupos de Reactome v68: mitosis, SUMOiladas y centrosoma. UPS, Unused ProtScore; Global FDR 1%; 92,6% confidence.

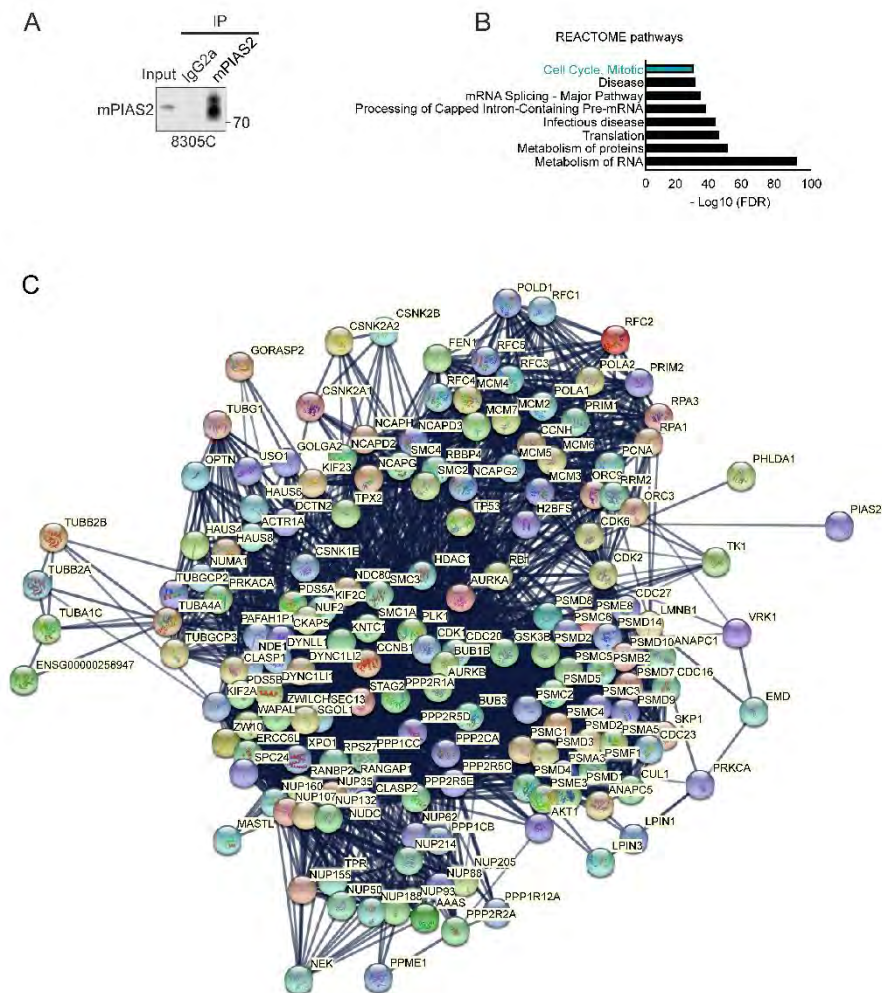
Proteínas identificadas relacionadas con Mitosis CYTO_Reactome (n=170)			Proteínas identificadas como SUMOiladas (PTM PATHWAY, GO) (n=58)			Proteínas identificadas como CENTROSOME GO:0005813 (n=99)		
Protein Entry	Protein Name	UPS	Protein Entry	Protein Name	UPS	Protein Entry	Protein Name	UPS
Q9NRG9	AAAS	11,14	Q13362+AA 6:A1779	2A5G	2,13	P30153	2AAA	36,39
P61163	ACTR1A	15,28	P52209	6PGD	46,27	Q9UH17	ABC3B	2,05
P31749	AKT1	7,51	P11310	ACADM	8,61	P33121	ACSL1	9,41
Q9H1A4	ANAPC1	3,55	P52594	AGFG1	5,16	P61163	ACTZ	15,28
Q9UJX4	ANAPC5	3,48	P07858	CATB	22,85	O00116	ADAS	16,37
O14965	<b>AURKA</b>	5,33	A5YKK6	CNOT1	42,86	Q12802	AKP13	8,18
Q96GD4	AURKB	1,59	P02452	CO1A1	1,6	Q9BT22	ALG1	2,29
Q59HH6	BUB1B	1,98	Q9UBI1	COMD3	6,31	Q96CW1	AP2M1	34,47
O43684	<b>BUB3</b>	17,87	P04632	CPNS1	11,82	Q92572	AP3S1	4,37
P14635	<b>CENB1</b>	3,52	O15371	EIF3D	39,14	Q9NP61	ARFG3	2,86
P51946	CCNH	2	O00519	FAAH1	2	Q5T2E6	ARMD3	2,04
Q13042	CDC16	1,97	P52272	HNRPM	76,52	P61158	ARP3	43,56
Q12834	CDC20	8,34	Q15418	KS6A1	1,75	O14981	BTAFA1	1,18
Q9UJX2	CDC23	2,11	P42167	LAP2B	5,25	Q13895	BYST	9,78
P30260	CDC27	4,19	Q08380	LG3BP	5,37	Q14790	CASP8	7,45
P06493	<b>CDK1</b>	34,99	P49736	<b>MCM2</b>	37,09	Q9HSV8	CDCP1	9,34
P24941	<b>CDK2</b>	13,16	P26038	MOES	30,94	P24941	<b>CDK2</b>	13,16
Q00534	CDK6	3,57	Q9UKD2	MRT4	11,62	Q9H7E9	CH033	3,56
Q14008	CKAP5	75,77	Q9Y2X3	<b>NOP58</b>	12,27	Q99653	CHP1	2
Q9BQT5	CLASP1	17,71	Q9BVL2	NUP58	4,22	O14967	CLGN	2,1
Q9NSZ2	CLASP2	3,57	Q9UBD5	ORC3	6,13	P0C0L4	CO4A	5,09
P49674	CSNK1E	10,34	P11940	<b>PABP1</b>	54	P53621	COPA	119,27
P68400	CSNK2A1	18,48	Q99497	PARK7	3,78	Q9Y678	COPG1	74,16
P19784	CSNK2A2	11,95	P17858	PFKAL	47,98	Q12996	CSTF3	2,02
P67870	CSNK2B	7,29	O75928	<b>PIAS2</b>	2,28	Q92841	DDX17	32,68
Q13616	CUL1	4,05	O75915	PRAF3	4,55	Q96Q07	DDX27	10,2
Q13561	DCTN2	8,48	P35080	PROF2	2,06	Q9UJV9	DDX41	1,64
Q9Y6G9	DYNC1LI1	15,69	Q05209	PTN12	29,33	Q00796	DHSO	15,98
O43237	DYNC1LI2	24,21	P17812	PYRG1	39,16	Q7Z478	DHX29	13,81
P63167	DYNLL1	3,95	P04049	RAF1	1,6	Q9P265	DIP2B	4,68
P50402	EMD	11,02	Q96PK6	RBM14	19,79	Q5F1R6	DJC21	1,44
Q2NKK8	ERCC6L	10,08	P29558	RBMS1	4,52	Q14195	DPYL3	55,28
P39748	FEN1	37,68	P49792	<b>RBP2</b>	25,83	Q9Y3I1	FBX7	5,69
Q08379	GOLGA2	4,29	Q92804	RBP56	5,02	Q53EP0	FND3B	2,35
Q9H8Y8	GORASP2	1,55	Q99496	RING2	1,68	P14324	FPPS	7,03
P49841	GSK3B	8,73	P27635	RL10	24,01	P06744	G6PI	16,6
P57053	H2BFS	11,03	P78346	RPP30	5,87	Q9Y223	GLCNE	3,46
Q9H6D7	HAUS4	2,01	Q8N122	RPTOR	5,19	Q08378	GOGA3	18,55
Q7Z4H7	HAUS6	4,26	Q9Y291	RT33	1,15	P48637	GSHB	2
Q9BT25	HAUS8	2	Q9UBE0	SAE1	8,89	P13807	GYS1	13,85
Q13547	HDAC1	8,24	Q8NBX0	SCPD1	5,77	Q9BT25	HAUS8	2
Q02241	KIF23	11,56	Q14683	<b>SMC1A</b>	16,25	Q9Y450	HBS1L	1,7
O00139	KIF2A	14,13	Q965B4	SRPK1	14,74	P42858	HD	12,86
Q99661	KIF2C	24,21	Q13247	SRSF6	13,82	Q9UBN7	HDAC6	4
P50748	KNTC1	5,81	Q9UEW8	STK39	5,7	O14964	HGS	14,56
P20700	LMNB1	9,2	P14868	SYDC	51,23	O14979	HNRDL	8,15
Q14693	LPIN1	2,01	P23381	SYWC	17,27	Q5SSJ5	HP1B3	20,85
Q9BQX8	LPIN3	4,73	Q03518	TAP1	2,49	O43187	TRAK2	1,78
Q96GX5	MASTL	12,08	Q13509	TBB3	13,96	Q13557	KCC2D	7,46
P49736	<b>MCM2</b>	37,09	Q13263	TIF1B	26,61	Q14693	LPIN1	2,01
P25205	MCM3	42,15	Q8WUJ6	TM263	3,43	Q9Y608	LRRF2	2,71

P33991	MCM4	35,04	P33981	TTK	4,66	Q3MHD2	LSM12	2,03
P33992	MCM5	28,27	Q93008	USP9X	7,84	Q5VWZ2	LYPL1	1,33
Q14566	MCM6	27,08	P18206	VINC	68,21	Q7Z434	MAVS	4,13
P33993	MCM7	52,82	Q9Y2W2	WBP11	8,9	Q9NR56	MBNL1	5,41
Q15021	NCAPD2	48,62	P12956	XRCC6	51,82	P52701	MSH6	30,8
P42695	NCAPD3	8,26	Q8IZH2	XRN1	2,21	P24844	MYL9	4
Q9BPX3	NCAPG	19,32	Q43264	ZW10	10,37	Q43795	MYO1B	67,69
Q86X12	NCAPG2	2,69				Q14978	NOLC1	2,62
Q15003	NCAPH	19,56				Q9Y2X3	NOP58	12,27
Q14777	NDC80	4,1				P11940	PABP1	54
Q9NXR1	NDE1	2,31				Q99497	PARK7	3,78
Q8TDX7	NEK7	6,25				Q75340	PDCD6	1,91
Q9Y266	NUDC	3,52				Q9BRX2	PELO	3,44
Q9BZD4	NUF2	4,01				Q8WV24	PHLA1	2,01
Q14980	NUMA1	4,91				Q16512	PKN1	7,43
P57740	NUP107	4,15				Q96GD0	PLPP	4,99
Q8WUM0	NUP133	2,47				Q08209	PP2BA	2,11
Q75694	NUP155	15,86				P53041	PPP5	1,61
Q12769	NUP160	7,37				Q00743	PPP6	7,06
Q5SRE5	NUP188	16,76				Q9UMS4	PRP19	37,79
Q92621	NUP205	2,72				P48651	PTSS1	3,06
P35658	NUP214	6,83				P06400	RB	3
Q9UKX7	NUP50	2,18				Q9Y3P9	RBGP1	1,53
P37198	NUP62	3,34				P49792	RBP2	25,83
Q9BW27	NUP85	5,55				P50914	RL14	10,58
Q99567	NUP88	8,39				P63173	RL38	8,72
Q8N1F7	NUP93	33,76				Q13405	RM49	2
Q96CV9	OPTN	2,26				P63162	RSMN	3,79
Q13416	ORC2	3,42				Q9NQ3	RTN4	9,8
Q9UG44	ORC3	6,13				Q9NTJ5	SAC1	2,02
P43034	PAFAH1B1	5,11				Q15393	SF3B3	14,62
P12004	PCNA	28,22				A6NHR9	SMHD1	14,68
Q29RF7	PDS5A	14,98				P53814	SMTN	2,38
Q9NTI5	PDS5B	4,62				Q9Y5X2	SNX8	7,68
Q8WV24	PHLDA1	2,01				Q9NS26	SPNXA	1,33
Q75928	PIAS2	2,28				P37108	SRP14	15,87
P53350	PLK1	5,02				Q9Y6E0	STK24	15,55
P09884	POLA1	3,92				Q01995	TAGL	3,16
Q14181	POLA2	2,08				P23193	TCEA1	2,38
P28340	POLD1	16,44				P50990	TCPO	13,39
P62136	PP1A	34,57				Q14776	TCRG1	12,62
P62140	PP1B	4,94				Q00403	TF2B	1,6
Q9Y570	PPME1	9,93				Q6NUQ4	TM214	12,83
P62140	PPP1CB	4,94				Q9BTV4	TMM43	5,55
P36873	PPP1CC	3,09				Q9NXH9	TRM1	5,26
Q14974	PPP1R12A	16,04				P17480	UBF1	13,1
P67775	PPP2CA	23,06				P50552	VASP	9,92
P30153	PPP2R1A	36,39				Q96QU8	XPO6	2,04
P63151	PPP2R2A	14,81						
Q13362	PPP2R5C	2,13						
Q14738	PPP2R5D	22,49						
Q16537	PPP2R5E	3,19						
P49642	PRIM1	2,75						
P49643	PRIM2	7,51						
P17612	PRKACA	16,87						
P17252	PRKCA	7,88						
P25788	PSMA3	3,62						
P28066	PSMA5	10,37						
P49721	PSMB2	2,03						
P62191	PSMC1	33,14						
P35998	PSMC2	28,47						
P17980	PSMC3	31,6						
P43686	PSMC4	39,91						
P62195	PSMC5	29,28						
P62333	PSMC6	30,22						

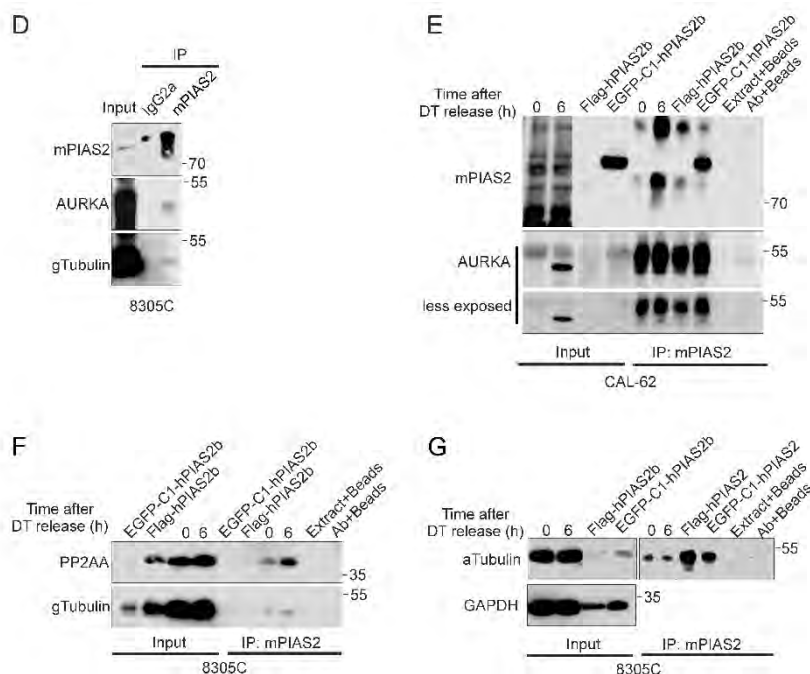
Q99460	PSMD1	12,8						
O75832	PSMD10	4,56						
O00231	PSMD11	42,33						
Q96112	PSMD2	84,55						
O43242	PSMD3	47,3						
P55036	PSMD4	13,28						
Q16401	PSMD5	28,68						
P51665	PSMD7	5,12						
P48556	PSMD8	8,75						
O00233	PSMD9	7,38						
Q9UL46	PSME2	10						
P61289	PSME3	8,45						
Q92530	PSMF1	10,58						
P49792	RANBP2	25,83						
P46060	RANGAP1	40,8						
P06400	RB1	3						
Q09028	RBBP4	4,04						
P35251	RFC1	8,54						
P35250	RFC2	6,67						
P40938	RFC3	9,72						
P35249	RFC4	10,19						
P40937	RFC5	18,61						
P27694	RPA1	1,14						
P35244	RPA3	1,82						
P42677	RPS27	4,41						
P31350	RRM2	10,41						
P55735	SEC13	12,88						
Q9BVA8	SGOL1	1,62						
P63208	SKP1	1,95						
Q14683	SMC1A	16,25						
O95347	SMC2	63,1						
Q9UQE7	SMC3	11,09						
Q9NTJ3	SMC4	58,18						
Q8NBT2	SPC24	5,92						
Q8N3U4	STAG2	4,75						
P04183	TK1	11,94						
Q9NZD0	TP53	4,55						
P12270	TPR	3,1						
Q9ULW0	TPX2	5,89						
Q9BQE3	TUBA1C	8						
P68366	TUBA4A	10						
Q13885	TUBB2A	2,4						
Q9BVA1	TUBB2B	9,26						
ENSP00000								
320295	TUBB3	13,96						
P23258	TUBG1	23,62						
Q9BSJ2	TUBGCP2	10,51						
Q96CW5	TUBGCP3	5,71						
O60763	USO1	22,21						
Q7Z460	VRK1	7,33						
Q7Z5K2	WAPAL	3,94						
O14980	XPO1	64,1						
O43264	ZW10	10,37						
Q9H900	ZWILCH	1,32						

Se muestran el código de registro en Uniprot, y los coeficientes para cada una de ellas. Rojo= proteínas estudiadas en este trabajo. Azul= proteínas repetidas en más de un listado.

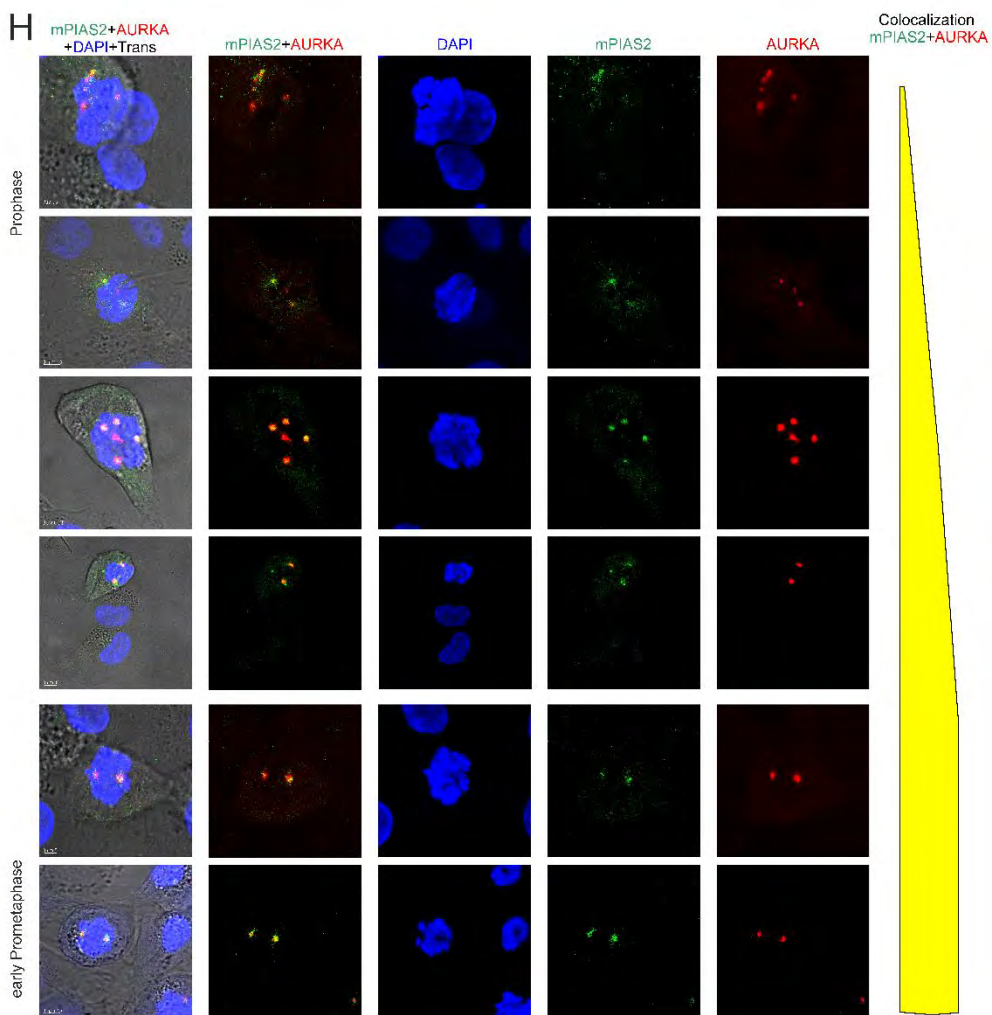


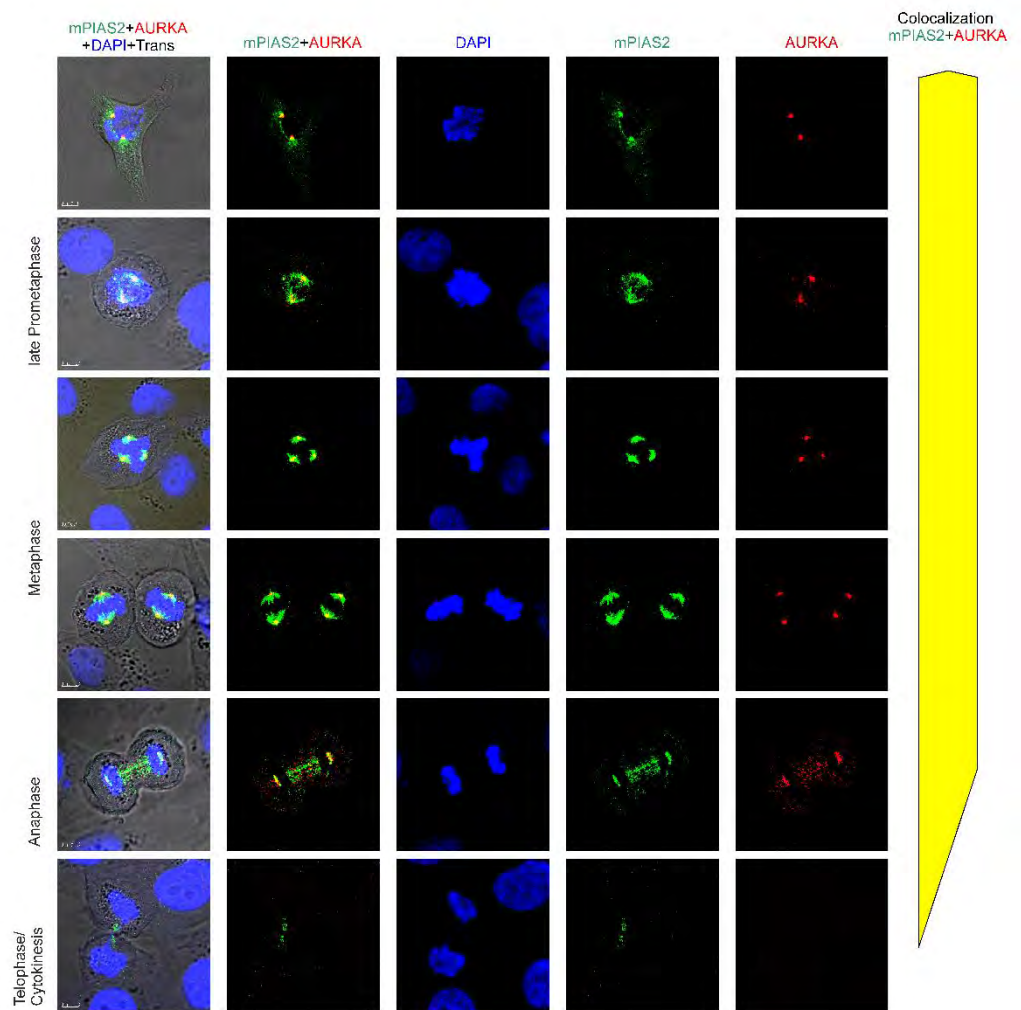






**Figura IV.20. Proteínas que se unen a PIAS2 en mitosis identificadas mediante proteómica global.** A) Inmunoprecipitación específica de PIAS2 en células 8305C sincronizadas con DT y 6 horas tras su lavado, y utilizando mPIAS2 y como control en los mismos extractos inmunoglobulina del mismo isotipo mIgG2a. B) Clasificación de las proteínas significativamente asociadas a PIAS2 en los principales grupos funcionales del REACTOME, destacando mitosis. C) Nube de proteínas clasificadas en el grupo de mitosis. D-E) Co-inmunoprecipitación de PIAS2, AURKA y Tubulina gamma en 8305C 6 horas tras DT-Release (D) y de PIAS2 y AURKA en CAL-62 en DT-Release tras 0 y 6 horas o en células asincrónicas sobreexpresando PIAS2 exógeno (E). F-G) Co-inmunoprecipitación de PIAS2 con la subunidad reguladora de la fosfatasa PP2 (PP2AA) y Tubulina gamma (F) o Tubulina alfa (G) en 8305C en DT-Release tras 0 y 6 horas o en células asincrónicas sobreexpresando PIAS2 exógeno. H) Colocalización por microscopía confocal de PIAS2 y AURKA durante las distintas fases de la mitosis. En amarillo un histograma representativo de la intensidad de dicha colocalización.





Para comprobar nuestros resultados de proteómica, hicimos inmunoprecipitación contra mPIAS2 seguido de western para algunas de las proteínas identificadas (Fig IV.20-D-G). Se puede observar que mPIAS2 se une a AURKA tanto en células 8305C como en CAL-62. Además, también se une a PP2AA (PP2CA), la subunidad catalítica de la fosfatasa PP2A, a Tubulina gamma 1 (gTubulin) y a Tubulina alfa (aTubulin). En todas estas proteínas se observa una unión mayor en extractos enriquecidos en mitosis (DT+*release* 6 h) con la excepción de aTubulin. Finalmente, en extractos de células con proteínas PIAS2 exógenas transfectadas, que bloquean la mitosis como se explicó anteriormente (Fig IV.12), hay baja o nula unión a estas proteínas con la excepción, de nuevo, de aTubulin.

Nuestro siguiente paso fue realizar un estudio por microscopía confocal para entender el proceso por el que se producía esta asociación entre las proteínas de mitosis y PIAS2. Elegimos de primera AURKA al ser una de las kinasas claves de la mitosis y ser su score más elevado que el de AURKB.

En células en Profase, la unión entre AURKA y PIAS2 es parcial, y AURKA parece más abundante que PIAS2 (Fig IV.20-H). Conforme avanza la profase hacia la prometafase, se va observando una unión cada vez mayor y mayor abundancia de PIAS2. Desde la prometafase, durante toda la metafase y anafase la colocalización es absoluta y parece que AURKA se encuentra en el centro de PIAS2 (Fig IV.20-H).

A partir de la Anafase, AURKA disminuye su intensidad y desaparece en la Telofase. En Telofase, también PIAS2 se mantiene presente en el haz de microtúbulos entre los dos núcleos, aunque con menor intensidad, para desaparecer en la citokinesis (no mostrada) (Fig IV.20-H).

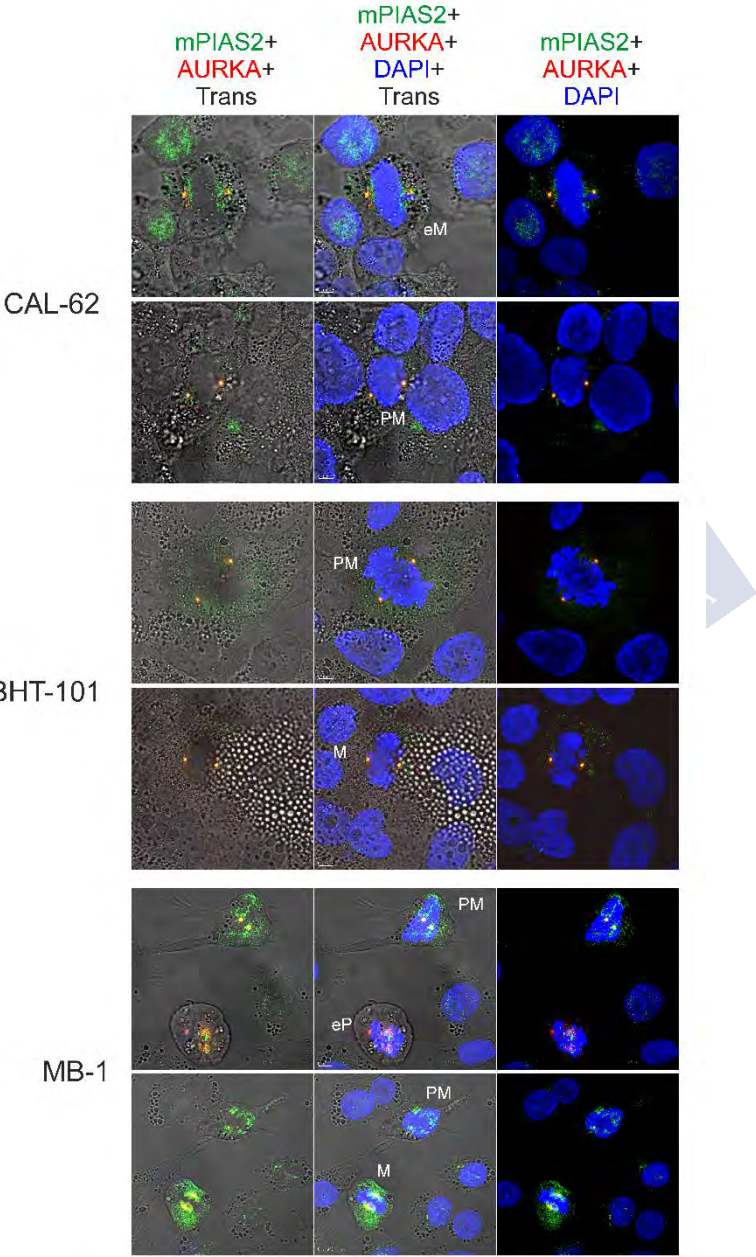
Para comprobar que esta colocalización con AURKA se repetía en todas las células anaplásicas independientemente de su origen línea celular o cultivo primario, repetimos el estudio en las líneas CAL-62, BHT-101 y MB-1 (Fig IV.21-A), y en los tres cultivos primarios establecidos de pacientes (Fig IV.21-B). De nuevo observamos que excepto en profase temprana, donde sólo colocalizan parcialmente, en todas las demás fases de mitosis las dos proteínas están unidas.



**Figura IV.21. PIAS2 y AURKA colocalizan en mitosis en carcinoma anaplásico de tiroides.** La tinción con mPIAS2 y AURKA se registró mediante microscopía confocal con idénticas condiciones a la figura 19. **A)** Tinción en líneas celulares CAL-62, BHT101 y MB-1. **B)** Tinción en los tres cultivos primarios de carcinoma anaplásico de tiroides obtenidos de dos pacientes (T-UC1, T-UC2, T-UC3).

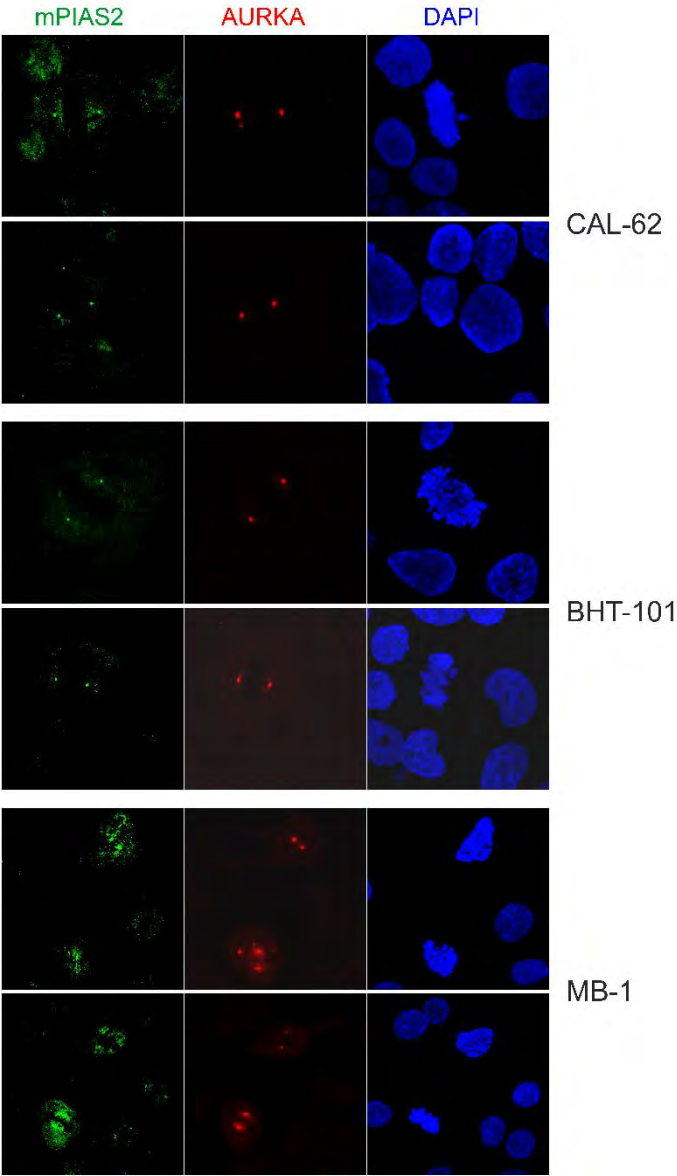
A

Anaplastic Cell Lines





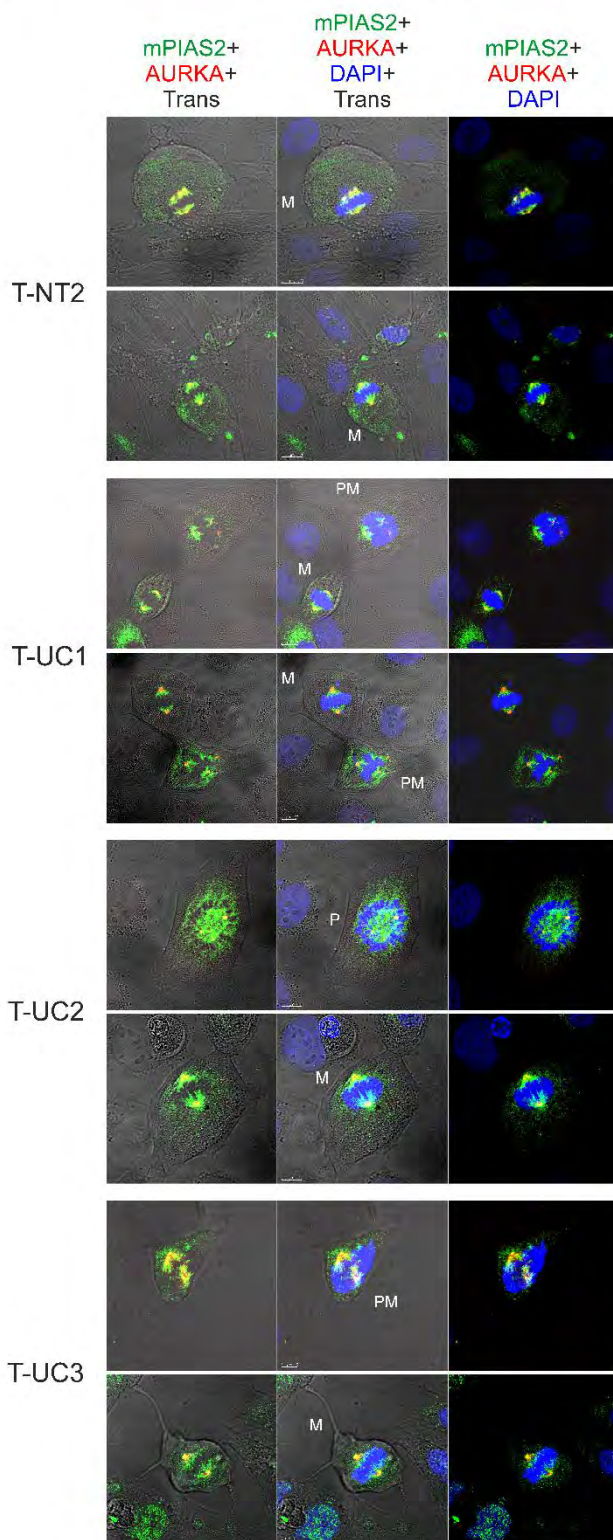
Anaplastic Cell Lines



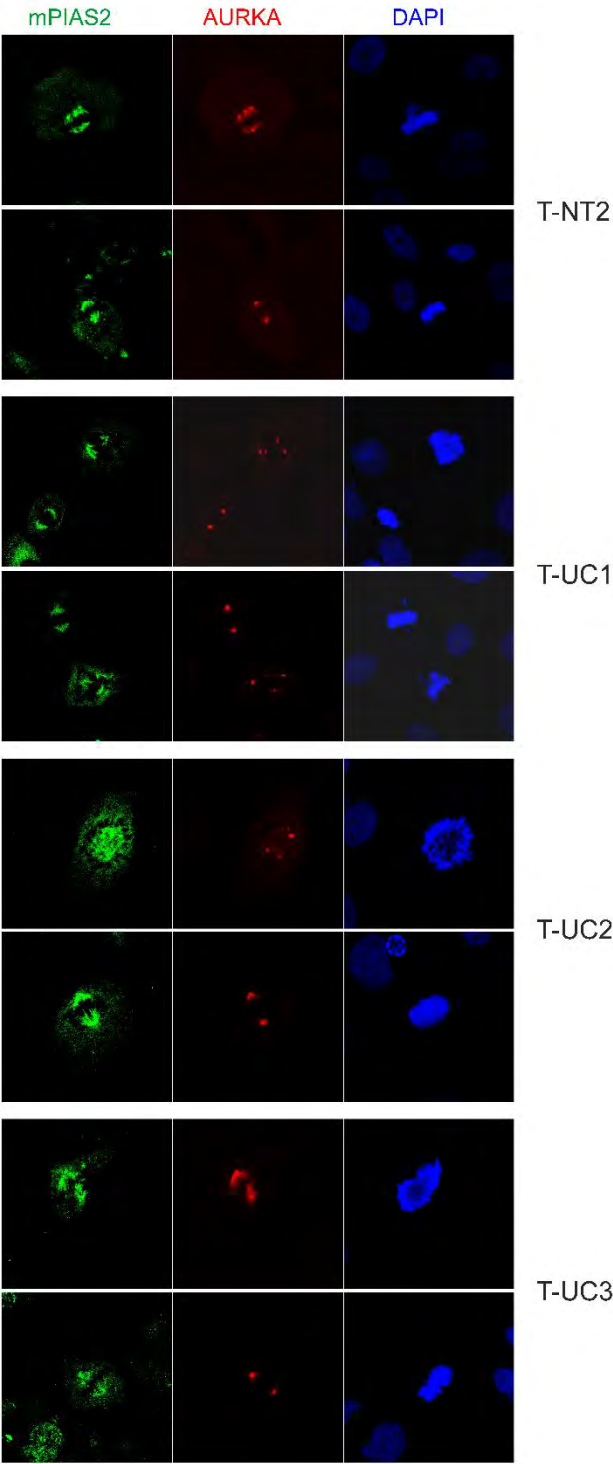


B

Patients' cultures



Patients' cultures



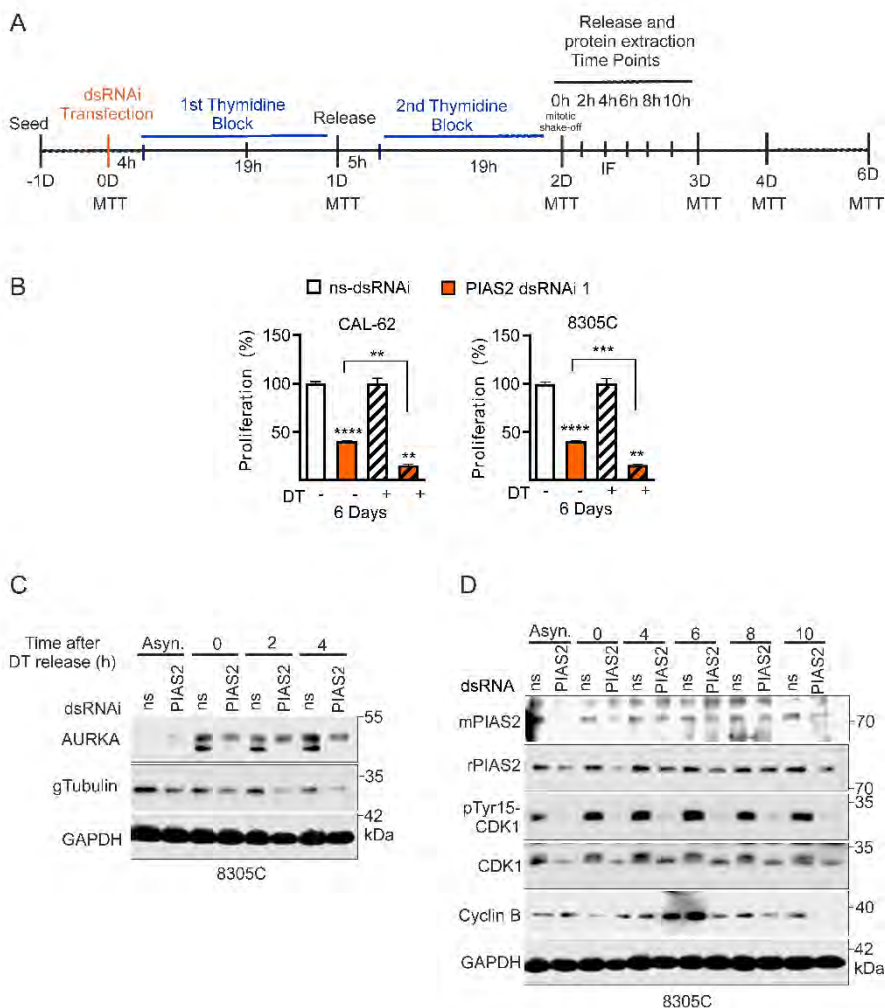
#### ***IV.12 PIAS2 dsRNAi 1 bloquea la mitosis desde su comienzo generando alteraciones centrosómicas y parada en la dinámica de los kinetocoros***

La función clave de PIAS2 en células anaplásicas parece ser en mitosis, ya que las células con PIAS2 dsRNAi 1 se mueren por catástrofe mitótica. Para entender el mecanismo, al mismo tiempo que las tratábamos con control ns-dsRNAi o con PIAS2 dsRNAi 1 sincronizamos a las células con DT y las seguimos tras el *release* (Fig IV.22-A). La primera e importante observación es que había diferencias significativas en la efectividad aún mayor de nuestro dsRNAi cuando las células estaban en mitosis (Fig IV.22-B), reforzando el resultado de que el efecto clave del dsRNAi es durante mitosis.

Cuando analizamos extractos celulares comparando los dos dsRNAi a lo largo de las horas tras el lavado pudimos observar que, en las células con PIAS2 dsRNAi, AURKA tenía una única banda superior, en vez de el doblete (fosforilada/no fosforilada) característico de las células tratadas con el control ns-dsRNAi (Fig IV.22-C). En correlación, CDK1 estaba completamente activada en presencia de PIAS2 dsRNAi 1 ya que aparecía una banda inferior única en vez de una banda gruesa más alta, y no se detectaba señal para p-Tyr15 CDK1, que es la fosforilación que mantiene inhibido CDK1 hasta el inicio de la mitosis (Fig IV.22-D).

La ciclina B se acumula en el momento cumbre de la entrada en mitosis de la mayoría de las células a las 6 horas tras el *release* en células tratadas con el control ns-dsRNAi. En contraposición a los datos anteriores, ciclina B se acumula a las 4 horas (más rapidez en entrada en mitosis, CDK1 completamente activada) pero cae a las 6 horas (bloqueo en mitosis) en las células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1 (Fig IV.22-D).

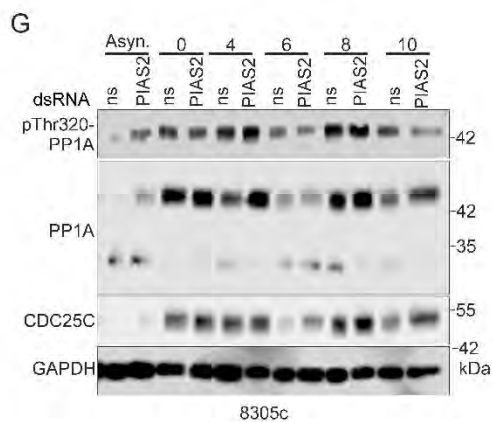
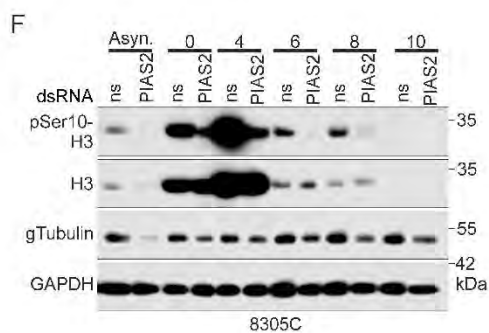
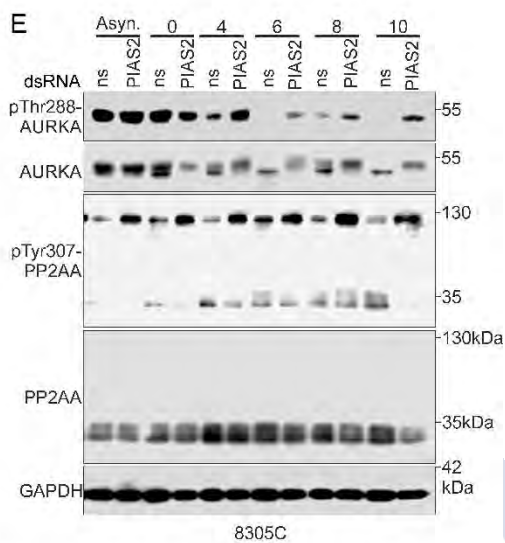
AURKA tiene varios sitios de fosforilación, unos activadores y otros inhibidores. Entre los activadores están las Treoninas 287 y 288



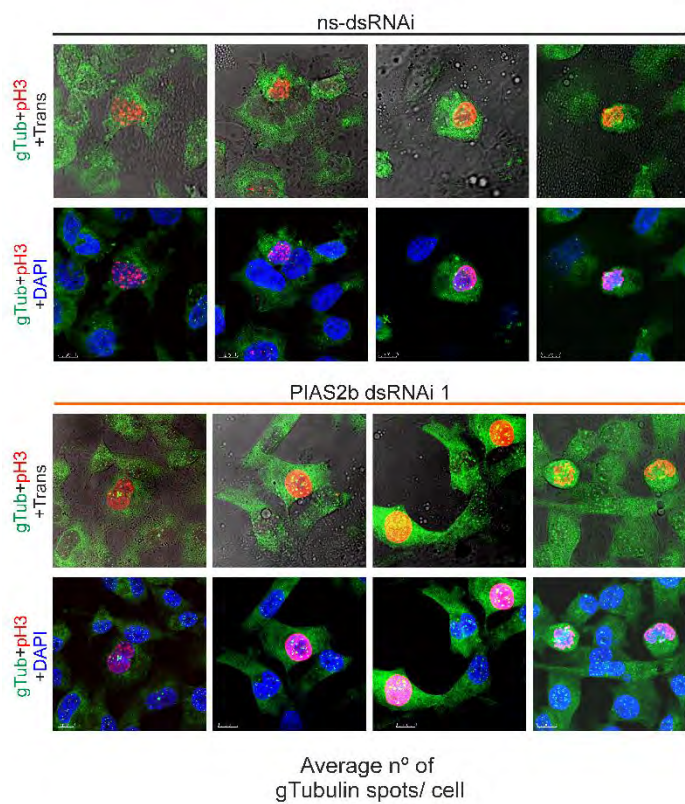
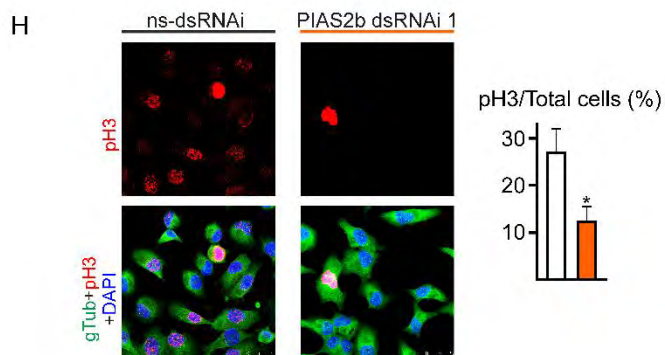
**Figura IV. 22. PIAS2 dsRNAi 1 impide la progresión de la mitosis, alterando el huso.**

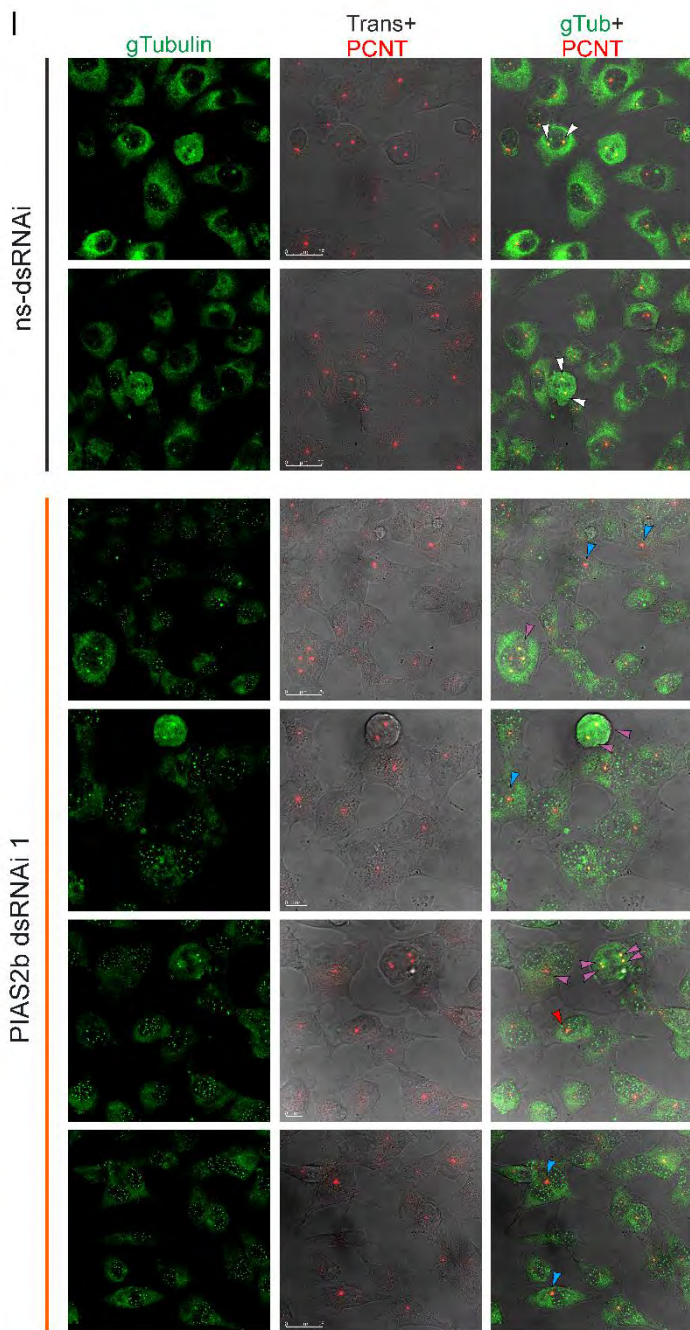
**A)** Diseño experimental para la administración de los dsRNAi (PIAS2 o ns) en paralelo a su sincronización en mitosis con DT seguido de *release* a 4, 6, 8 y 10 horas (para extractos y microscopía confocal) o periodos más largos para medir proliferación. **B)** En células sincronizadas en mitosis, se potencia significativamente la acción antitumoral de PIAS2 dsRNAi 1. **C)** PIAS2 dsRNAi 1 acumula células con AURKA fosforilada. **D)** En paralelo, en presencia de PIAS2 dsRNAi 1 CDK1 está completamente activado como se observa por la ausencia de pTyr15-CDK1 que es una fosforilación inhibitoria. Los niveles de Ciclina B a 4 y 6 horas demuestran que las células entran en mitosis, pero no prosiguen. **E)** Mientras que en células tratadas con ns-dsRNAi, pThr288 AURKA (activada) descienden según progresa la mitosis, con PIAS2 dsRNAi 1 AURKA se mantiene permanentemente fosforilada. Patrón característico de p-Thr307-PP2AA (inhibitoria) en células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1: se acumula una banda fosforilada a 130kDa mientras disminuye la banda de p35. **F)** pSer10-Histona H3 (activa) disminuye fuertemente sus niveles en presencia de PIAS2 dsRNAi 1, mientras que sólo se observa una disminución ligera de Tubulina gamma. **G)** No se observa alteración del patrón de PP1A. CDC25C se acumula en células con PIAS2 dsRNAi 1 conforme pasa el tiempo. **H)** Acumulación de *spots* de Tubulina gamma. **I)** Co-localización de Pericentrina (PCNT, centrosomas) y Tubulina gamma (gTub) en células tratadas con ns-dsRNAi o PIAS2 dsRNAi 1. PCNT no co-localiza con los *spots* de gTub. Flechas: blancas, dos nucléolos por célula mitótica; Violeta: nucléolos desiguales en la misma célula; Rojas: grandes nucléolos; Azules: nucléolos no esféricos (fuzzy) Gráficas: Cuantificación de las alteraciones centrosómicas en número (arriba) o estructura (abajo). **J)** Co-localización de Tubulina gamma (gTub) y BUB3 en *spots* en células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1. Las células normales presentan BUB3 difuso con infrecuentes *spots* de gTub en el núcleo. BUB3 aumenta en mitosis. Cabezas de Flecha: blancas, células en mitosis normal con altos niveles de BUB3; azules, células sin BUB3 incluso en mitosis, pero con *spots* de gTub; naranjas, células con dos nucléolos; rosas: células con muy intensa co-localización en los *spots*. Flecha amarilla: tinción filamentos de ambas proteínas colocalizadas. **K)** En células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1, BUB3 colocaliza con CREST (kinetocoros), mientras que algunas células no presentan tinción para BUB3. **L)** En células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1, gTub y CREST colocalizan. Alguna célula en mitosis mostrando alteraciones centrosómicas presenta CREST periférico.

(B: Media $\pm$ SEM de un n=3 con 3 replicados por condición en cada experimento. ANOVA; H-I: Media $\pm$ SEM para cada gráfica de un n=70; n=100; n=100 células. Mann-Whitney. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; \*\*\*\*, p<0.0001).

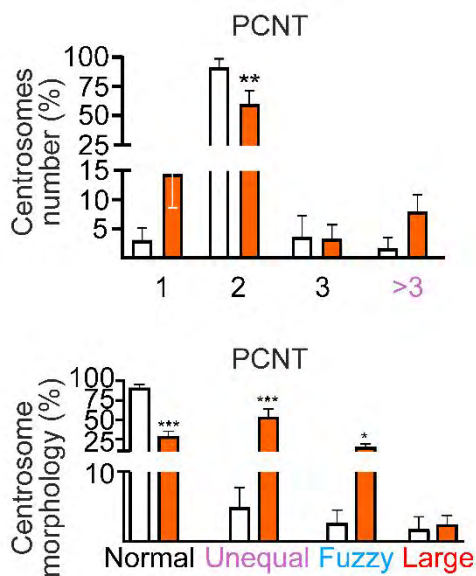
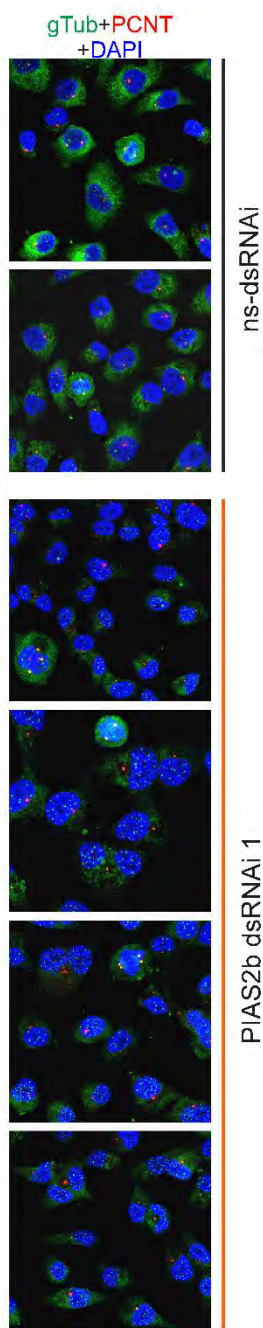


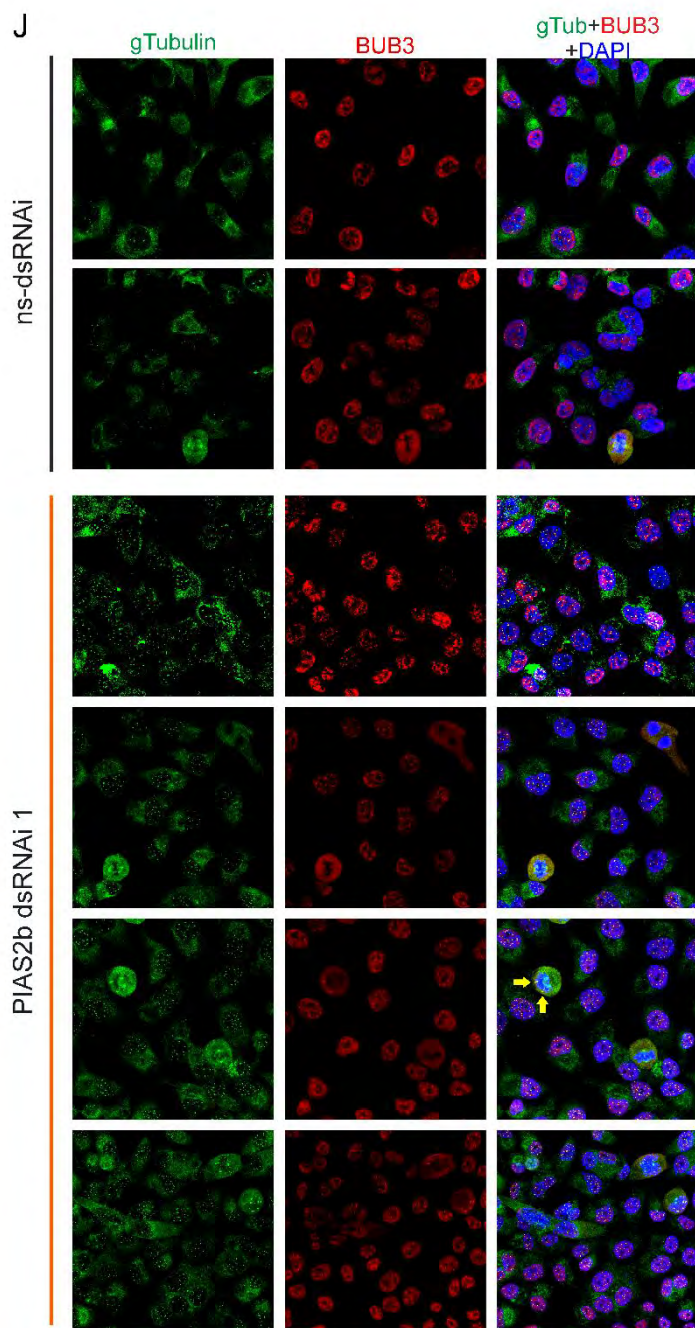


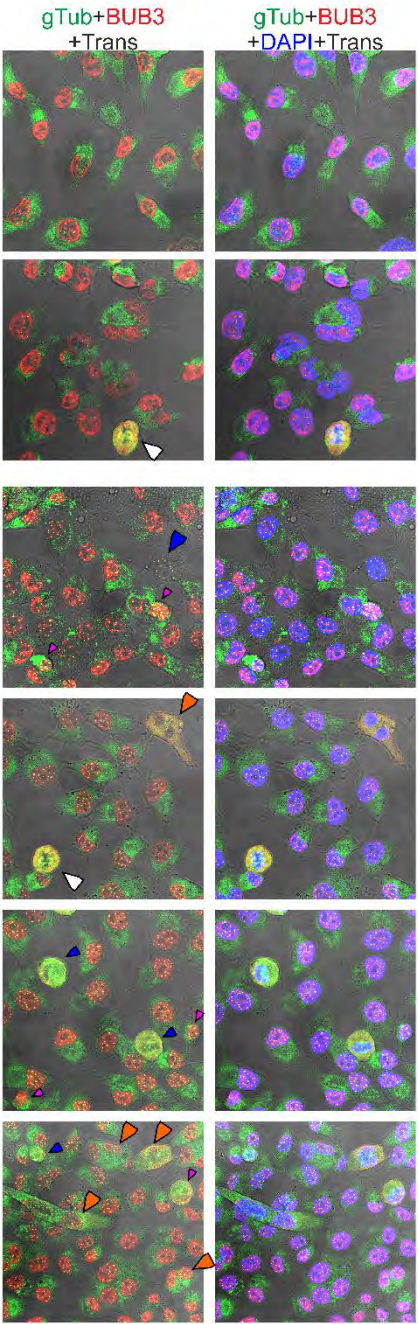












ns-dsRNAi

PIAS2b dsRNAi 1

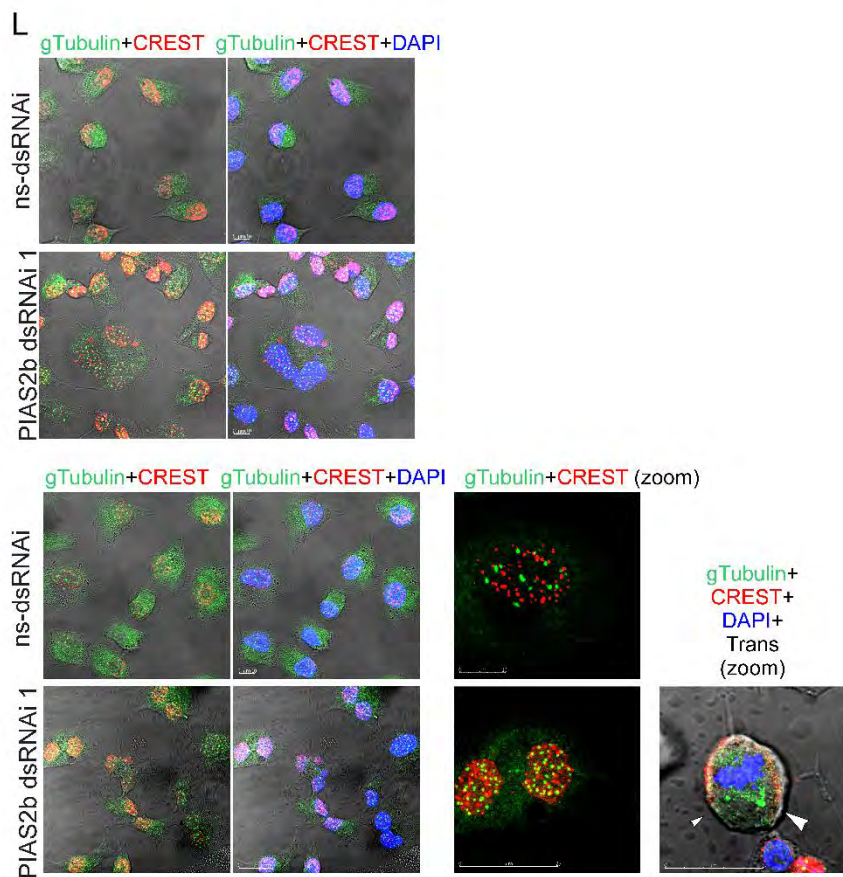
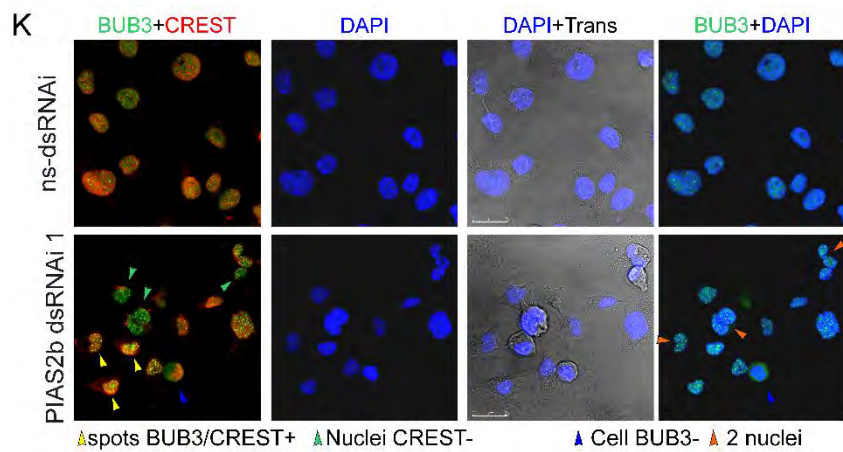
△ Normal mitosis  
BUB3+

▲ 2 nuclei

▲ Nucleus or Mitosis  
BUB3-

▲ condensed nuclei  
BUB3+

→ colocalization  
BUB3/gTub  
opposite side  
to altered spindle





dos residuos que son autofosforilados tras la unión a TPX2, el factor que nuclea los microtúbulos del huso y que acerca AURKA al microtúbulo (Walter et al, 2000; Hirota et al, 2003; Bayliss et al, 2003; Zhao et al, 2008). Para este proceso se necesita una nucleoporina, AAAS o Aladin que localiza AURKA en el centrosoma mientras se está formando el huso (Carvalho et al, 2015). Estos residuos también se fosforilan por la kinasa PAK1 a nivel del centrosoma (Zhao et al, 2005). Un resultado interesante es que tanto AAAS como TPX2, además de AURKA, se unen a PIAS2 de forma significativa en el estudio de proteómica global (ver Tabla IV.15).

AURKA es fosforilada por PAK1 además en la Treonina 352 de forma inhibitoria (Zhao et al, 2005). Y también se fosforila en las Serinas 41 y 51. La fosforilación en Ser-41 regula su vida media, ya que es el sitio diana de la fosfatasa PP2A para que se pueda degradar AURKA y proseguir la mitosis a partir de la metafase (Horn et al, 2007).

Nuestros datos indicaban una acumulación de AURKA fosforilada en presencia de PIAS2 dsRNAi 1 (Fig IV.22-C). Realizamos un western específico para p-Thr288-AURKA para comprobar si estaba más o menos activada. Como se puede observar en la figura IV.22-E, AURKA está mucho más activada en presencia de PIAS2 dsRNAi 1, lo que se corresponde con una mayor activación de CDK1.

La fosfatasa PP2A consiste en una unidad catalítica, PP2AA-C o PP2AA, y varias unidades reguladoras. PP2AA no tiene buenos anticuerpos funcionales que demuestren activación, pero tiene el residuo Tirosina 307 que cuando está fosforilado la actividad catalítica está inhibida (Horn et al, 2007; Uniprot, 2019 información deducida). Los niveles de pTyr307-PP2AA están aparentemente reducidos en presencia de PIAS2 dsRNAi sin variar de forma marcada los niveles totales de la proteína por lo menos hasta las 6 horas donde disminuyen. Menor pTyr307-PP2AA no cuadra con una mayor fosforilación de AURKA (Fig IV.22-E). Sin embargo, aparece una banda superior de alrededor de 130kDa consistentemente aumentada en todas las calles tratadas con PIAS2 dsRNAi (Fig IV.22-E). Esta banda no es reconocida por el anticuerpo contra PP2AA total, sugiriendo fuertes

modificaciones covalentes como por ejemplo ubiquitinización, lo cual inhibiría su actividad (Horn et al, 2007).

Por último, aunque los niveles de Histona H3 totales no varían demasiado con el tratamiento, la cantidad de pSer10-H3 está fuertemente disminuida en presencia de PIAS2 dsRNAi (Fig IV.22-F). La fosforilación de la cola N-terminal de H3 (y de otras histonas) en Ser10 y Ser 28 (realmente Ser11 y Ser 29 en la secuencia completa, pero se elimina la Metionina 1a de la proteína funcional) es clave para la condensación correcta de los cromosomas y es un signo del avance de los procesos de mitosis a nivel de los cromosomas (Goto et al, 1999; Garcia et al, 2005; Thomas et al, 2006). En general, es AURKB quién se encarga de esta fosforilación (Goto et al, 2002).

Otras enzimas que estudiamos, pero no encontramos diferencias apreciables son la fosfatasa PP1A total y su fosforilación inhibitoria en Treonina 320 (Pasder et al, 2006). pThr320 se regula durante la mitosis de forma similar en las células control tratadas con ns-dsRNAi y en las tratadas con PIAS2 dsRNAi 1, bajando a las 6 horas tras el *release* (Fig IV.22-G), como es esperable para la esperada progresión de mitosis (Dephoure et al, 2008; Olsen et al, 2010). La fosfatasa Cdc25C, encargada de defosforilar a CDK1 en tirosina induciendo su activación al comienzo de mitosis (Strausfeld et al, 1994), no parecía variar excepto por estar relativamente aumentada con PIAS2 dsRNAi 1 a partir de las 6 horas tras el *release* (Fig IV.22-G).

El hecho de que las células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1 no consigan fosforilar la histona H3 mientras tienen super-activadas a CDK1 y AURKA indica que las células no consiguen avanzar correctamente en la mitosis. Cuando teñimos para pSer10-H3 y Tubulina gamma observamos que hay menos células teñidas para pSer10-H3 tras el tratamiento con PIAS2 dsRNAi 1. Además, mientras en el tratamiento control las células positivas para pSer10-H3 que han empezado la mitosis presentan dos centrosomas claros con gTubulina, en las PIAS2 dsRNAi 1 aparece un patrón moteado (*spotty*) de gTubulina tanto en las células positivas para pSer10-H3 como en todas las demás (Fig IV.22-H). El número de *spots* por célula era significativamente mayor, y muy homogéneo en número en las células

tratadas con PIAS2 dsRNAi 1 (Fig IV.22-H). Alrededor de 21-23 *spots*, que era el número esperable de kinetocoros, aunque nuestras células son poliploides. La unión de Tubulina gamma a kinetocoros no está descrita en células humanas o de mamíferos durante mitosis. Sin embargo, hay un trabajo que describe unión de gTubulin a kinetocoros en meiosis de oocitos de *Drosophila*, precisamente durante la Profase I (Hughes et al, 2011). La Tubulina gamma 1 es esencial para la nucleación de los dos extremos de los dos microtúbulos en el kinetocoro durante la prometafase de la meiosis I de dichos oocitos.

Por otra parte, se ha descrito que la tinción en spots de proteínas como MAD2, marcando un elevado número de kinetocoros en vez de unos pocos, es un reflejo de retardo o parada en mitosis al no poder alinear correctamente la unión de los microtúbulos a ambos lados de los kinetocoros (Carvalho et al, 2015). Esto sucede por ejemplo cuando se reprime la expresión de la proteína Aladin (AAAS), una proteína que se encarga de que AURKA, HURP y HAUS6 se localicen correctamente en el uso mitótico para proseguir la mitosis (Carvalho et al, 2015). Curiosamente, AAAS, AURKA y HAUS6 son proteínas significativamente asociadas con PIAS2 en nuestro estudio de proteómica global (Tabla IV.15).

La Tubulina gamma participa desde el centrosoma en la nucleación de microtúbulos para generar el huso mitótico. Cuando se alteran algunas proteínas clave que participan en la formación del huso, los centrosomas se ven alterados en número o morfología (Müller et al 2010). Para estudiar si la tinción moteada (*spotty*) de Tubulina gamma coincidía con alteraciones del centrosoma co-teñimos para Pericentrina (marcador de centrosomas) y gTubulina (Fig IV.22-I). Las células controles (ns-dsRNAi) presentaban uno o dos centrosomas iguales, según hubieran ya empezado la mitosis, que colocalizaba con gTub en su centro (flechas blancas). Las células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1 presentaban un mayor número de células con más de 3 centrosomas, o con alterada morfología de los centrosomas, presentando un número significativamente mayor de centrosomas desiguales (flechas moradas), grandes (flechas rojas) o centrosomas no esféricos (*fuzzy*, flechas azules).



Como la tinción “spotty” de Tubulina gamma parecía sugerir localización cercana a kinetocoros co-teñimos para BUB3 y gTubulina (Fig IV.22-J). BUB3 es una proteína importante en mitosis, y una de sus funciones es asegurar la correcta unión entre los microtúbulos y el complejo del kinetocoro (Logarinho et al, 2008). En las células control en interfase (ns-dsRNAi), BUB3 presentaba una tinción nuclear difusa y coincidía con gTub en los discretos spots que aparecían en el núcleo; en células control en mitosis, BUB3 teñía difusamente toda la célula pudiendo estar localizada a lo largo del huso (flechas blancas) (Fig IV.22-J arriba). En células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1 la tinción para BUB3 era más intensa y colocalizaba con el patrón *spotty* de gTub (Fig IV.22-J abajo); se ven células marcadamente alteradas como algunas sin tinción difusa para BUB3 en el núcleo en interfase e incluso negativas durante mitosis (flechas azules); células con núcleo condensado muy intenso para BUB3 (flechas rosas); células con dos núcleos (flechas naranjas); y células en mitosis colocalizando BUB3 y gTub en un acúmulo periférico (flecha amarilla) pero no en el resto de la célula ni en el huso alterado.

Para estudiar propiamente el kinetocoro interno y externo, cotejamos con CREST (anticuerpos anti centrómeros o ACA característicos de la esclerodermia síndrome CREST) y BUB3 (Fig IV.22-K). En las células control (ns-dsRNAi) CREST marcaba los kinetocoros y BUB3 aparecía en algunos spots colindantes (tinción en pares, no colocalización exactamente) (Fig IV.22-K arriba). Por el contrario, en las células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1 aparecían células con BUB3 en *spots* sin CREST y CREST en grandes acúmulos perinucleares (flechas verdes); otras células presentaban *spots* gruesos en ambas tinciones con amplia colocalización (flechas amarillas), y alguna célula en mitosis no presentaba tinción para BUB3 mientras CREST teñía difuso (flecha azul) (Fig IV.22-K abajo). Células sin BUB3 en mitosis las habíamos ya visto en la Fig IV.22-J (secundario distinto marcado en fluorescencia roja); y también apreciábamos aquí como en esa figura, células con dos núcleos (flechas naranjas).

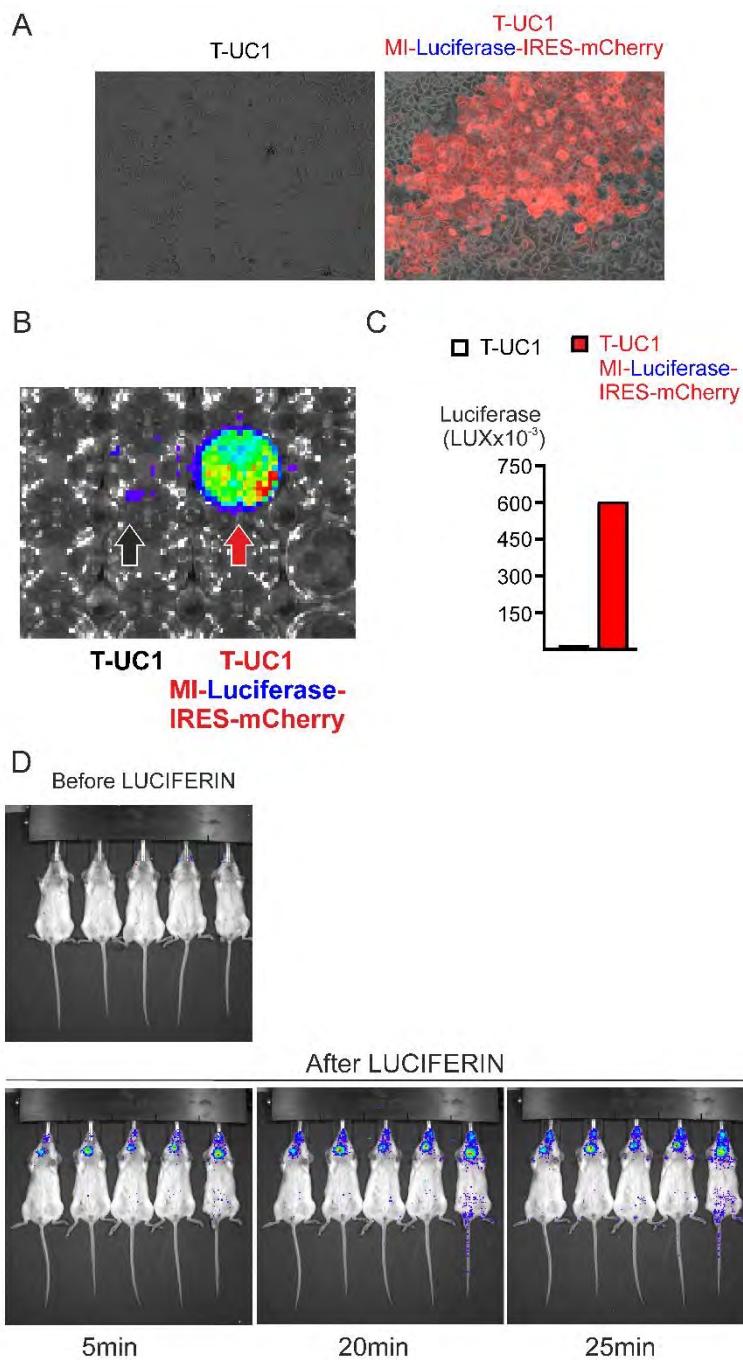
Un resultado similar lo obtuvimos en la tinción con CREST y gTubulina. Una tinción paralela y no colocalización (kinetocoro interno+kinetocoro externo) en los pocos *spots* de gTubulina de los

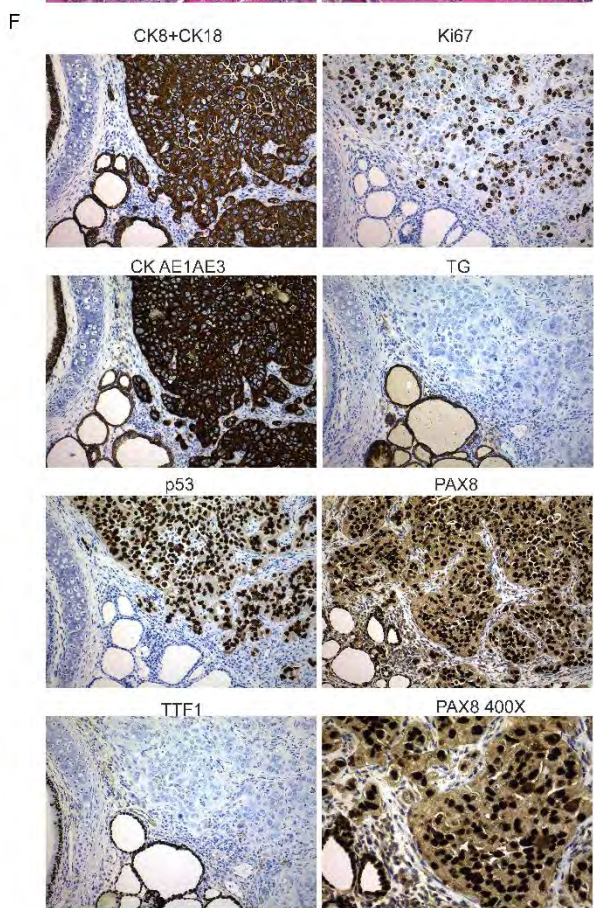
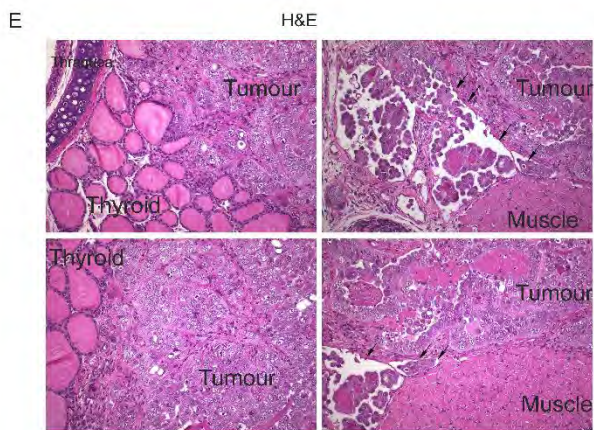
núcleos control (Fig IV.22-L arriba), mientras en las células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1 aparecía fuerte colocalización en los spots de ambas proteínas, y en alguna ocasional célula en mitosis con los centrosomas alterados aparecía CREST cercano a la membrana (flechas) (Fig IV.22-L abajo).

#### ***IV.13 PIAS2 dsRNAi 1 tiene efecto antitumoral en oPDX, un modelo preclínico in vivo***

En la actualidad se están probando y aprobando terapias basadas en nucleótidos antisentido para uso clínico (Wittrup and Lieberman, 2015; Levin, 2019; Yin et al, 2019). Nuestro PIAS2 dsRNAi tenía un comportamiento antitumoral específico de células anaplásicas de tiroides *in vitro*. Decidimos entonces desarrollar un modelo *in vivo* que tuviese relevancia con la clínica.

Las células de cáncer anaplásico se infectan mal con virus siguiendo los protocolos habituales. Tuvimos entonces que estandarizar comparativamente varios protocolos de infección.







**Figura IV.23. Modelo *in vivo* de carcinoma anaplásico de tiroides con Xenograft derivado de Paciente ortotópico (oPDX).** A) Células infectadas sin virus y con el virus expresando mCherry al microscopio óptico de fluorescencia/contraste de fases. B) Los mismos pocillos fotografiados tras la adición del sustrato luciferina fotografiados en el IVIS, donde se registrarán los animales. C) Cuantificación de la emisión de luz en luminómetro. D) Cinco ratones con oPDX de 2 semanas de evolución, registrados en el IVIS antes (*Before*) y después (*After*) de la inyección intraperitoneal de luciferina, y seguidos a lo largo del tiempo. E) Hematoxilina-Eosina de los carcinomas mostrando invasión de la tiroides sana y de estructuras adyacentes como músculo y vasos. F) La inmunohistoquímica realizada con las mismas condiciones que para patología humana muestra positividad para citokeratinas global (A1A3) y para CK8/CK18 como se espera en un carcinoma anaplásico. El carcinoma es negativo para marcadores de tiroides (Tiroglobulina, TG; NKX2-1/ TTF1) pero muy positivo para Ki67, p53 y PAX8.



Desarrollamos un vector viral con doble expresión de la enzima Luciferasa y mCherry separadas por un elemento IRES (*Internal Ribosomic Entry Site*) que asegura que aproximadamente por cada molécula de mCherry va a transcribirse una molécula de Luciferasa. De esta forma, es posible evaluar de forma rápida infección viral de la población por microscopía de fluorescencia convencional y a su vez asegurar la cuantificación posterior de la masa tumoral mediante luminiscencia.

En la Figura IV.23 se resume el desarrollo del modelo. Con el más eficiente protocolo de infección, una gran parte de las células expresan proteína fluorescente mCherry frente a las no infectadas (Fig IV.23-A). Estas mismas células emiten luz tras la adición de luciferina ya que expresan la proteína luciferasa combinada en el mismo virus y puede ser observada en el IVIS (Fig IV.23-B) y cuantificada de forma subsiguiente (Fig IV.23-C).

Las células se introducen en ratones NOD-SCID hembra por vía quirúrgica de forma cuidadosa en una localización paralela a la tráquea por debajo del músculo esternotiroideo derecho. Y se dejan recuperar por al menos dos semanas. Tras ese período, comienza la evaluación del crecimiento tumoral en el IVIS tras anestesia gaseosa rápida e inyección de luciferina *i.p.* (Fig IV.23-D). Podemos observar como el modelo es reproducible, ortotópicamente localizado y adquiere el punto máximo de medida entre los 20-30 minutos tras la inyección del sustrato luciferina.

Una vez validado el modelo animal se estudió la acción anticancerosa *in vivo* de PIAS2 dsRNAi 1. Para ello se generaron 9 xenografts ortotópicos derivados de paciente (*Orthotopic Patient Derived Xenograft*, oPDX). Los oPDX se dejaron crecer durante 5 semanas controlados mediante bioluminiscencia en el IVIS (Perkin Elmer). En este punto muchos de los ratones presentaban masas palpables en el cuello (lo que supone masas grandes para un cuello tan pequeño con tantas estructuras anatómicas). Entonces, se randomizaron los ratones y se trataron por vía sistémica con 40μM de dsRNAi mezclado con el vehículo Atelocollageno (AteloGene Koken,

Cosmobio), 2 veces a la semana durante las siguientes 3 semanas (Azuma et al, 2010; Sasaki et al, 2010).

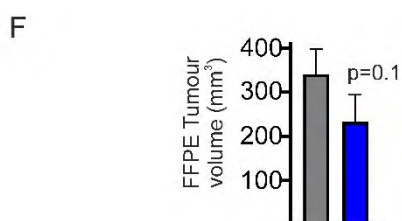
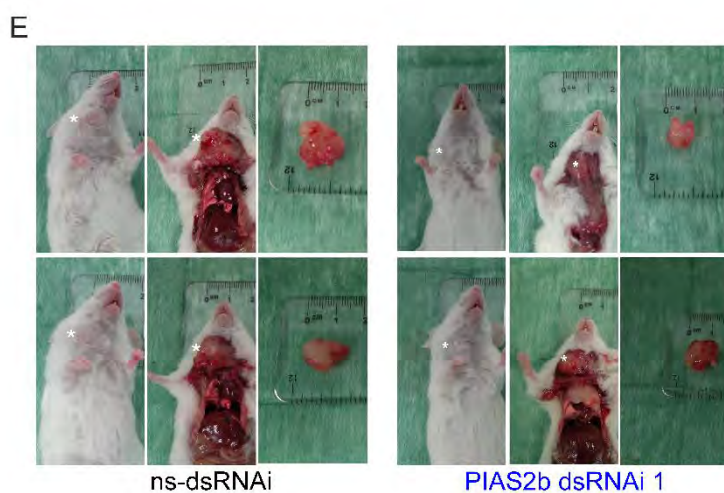
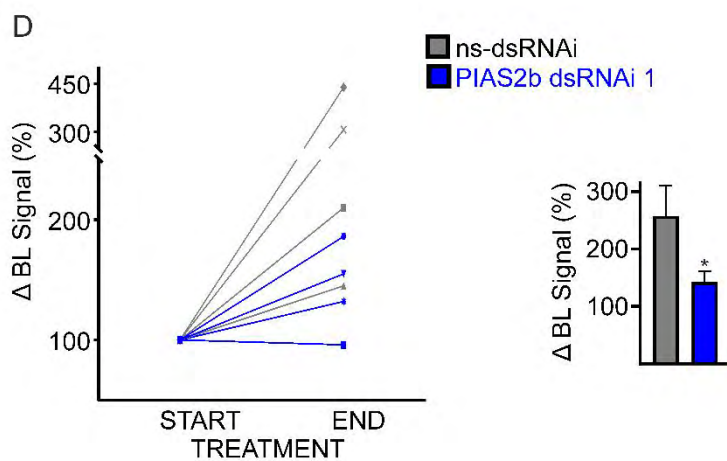
En el análisis histológico de preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina se observa invasión del tumor infiltrando el tejido tiroideo normal, angiointervención e invasión extratiroidea del tejido adiposo y muscular reproduciendo las características de los carcinomas anaplásicos humanos de tiroides (Fig IV.23-E). También se ha comparado la expresión de marcadores por inmunohistoquímica usando anticuerpos clínicamente validados para el diagnóstico de los carcinomas anaplásicos de tiroides (Fig IV.23-F). Los carcinomas oPDX presentan positividad para citoqueratinas global (A1A3) y para CK8/CK18, algo característico del carcinoma anaplásico. Los carcinomas oPDX son negativos para marcadores de diferenciación folicular tiroidea (Tiroglobulina, TG; NKX2-1/ TTF1) pero muy positivos para Ki67, p53 y PAX8 (Fig IV.23-F). Los datos patológicos de los tumores oPDX coinciden con las características de los carcinomas anaplásicos humanos.

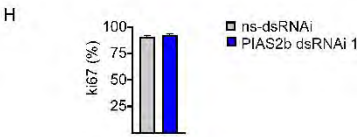
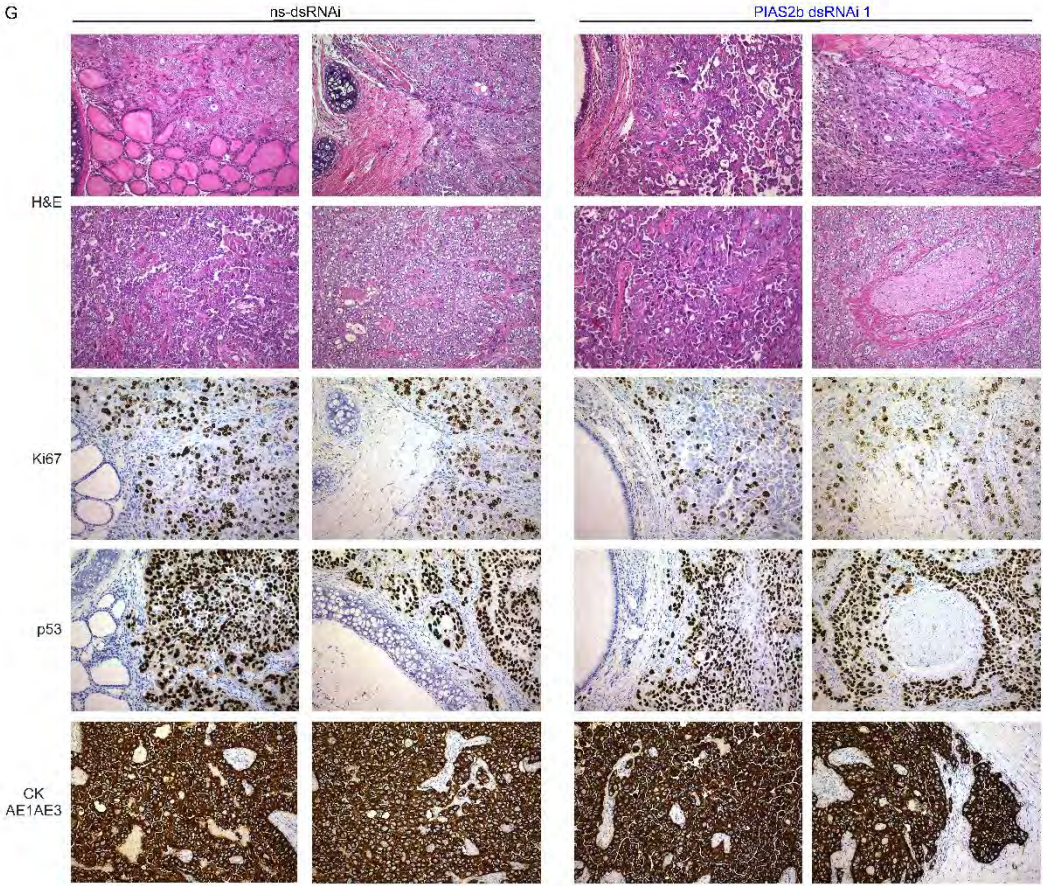
**Figura IV.24. PIAS2 dsRNAi 1 tiene acción anticancerosa in vivo.** A) Esquema del experimento con la generación de los ratones oPDX y el tratamiento con PIAS2 dsRNAi 1 (azul) o ns-dsRNAi (gris) una vez /semana durante tres semanas. El seguimiento se realizó con el IVIS una vez/semana. B) Curvas de evolución individuales ajustadas al 100% a la semana 5 en la que se comenzó el tratamiento. Evaluación final de la respuesta final según código RECIST-like y Choi (PD= *Progressive disease*; SD= *Stable Disease*; PR= *Partial response*). Línea gruesa: Curva Loess para las dos poblaciones ajustada por el programa de análisis. \* ratones que no terminaron el experimento C) Bioluminiscencia a lo largo del tratamiento en dos ratones tratados con ns-dsRNAi y PIAS2 dsRNAi 1 respectivamente. D) Normalización de la Intensidad inicial y final que resulta estadísticamente significativa. E) Disección de los carcinomas en el punto final. Se observan diferencias a simple vista. F) Los tumores fueron fijados, seccionados y su volumen tridimensional calculado a partir de las secciones. La diferencia tiene una  $p=0.1$ . G) Estudio patológico de los carcinomas tratados con ns-dsRNAi o PIAS2b dsRNAi-1. La Hematoxilina-Eosina muestra en los cánceres invasión de la tiroides sana y de estructuras adyacentes como músculo y vasos. La inmunohistoquímica realizada con las mismas condiciones que para patología humana muestra positividad para citokeratinas global (A1A3), como se espera en un carcinoma anaplásico y amplia positividad para Ki67 y p53, tanto para los tumores tratados con ns-dsRNAi como con PIAS2b dsRNAi-1. H) Contaje automático del porcentaje de células positivas para Ki67 que no mostró diferencias. I) Contaje sistemático de las células del carcinoma muertas o en transición a (200x, puntos amarillos; 400x flechas amarillas) frente a las células totales (200x, puntos violetas). La cuantificación mostró diferencias significativas en los carcinomas tratados con PIAS2 dsRNAi 1. (Media $\pm$ SEM de  $n=5$  de ratones con tratamiento ns-dsRNAi y  $n=4$  de ratones con tratamiento PIAS2b dsRNAi-1; B: ANOVA *Multiple comparisons*; D-F: Mann-Whitney; I: T-test. \*,  $p<0.05$ ).









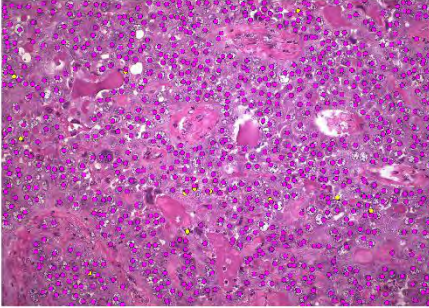




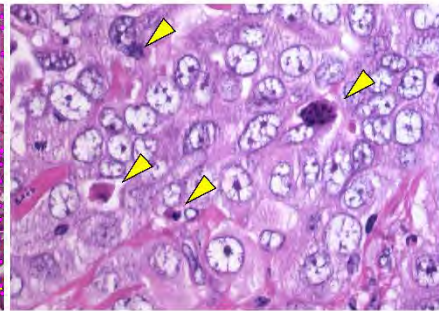
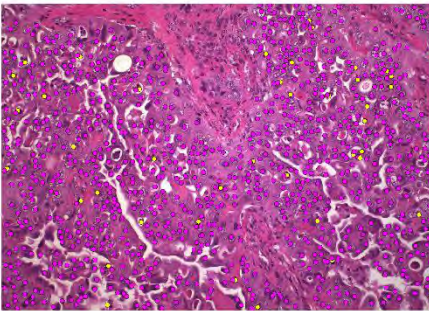
I

H&E

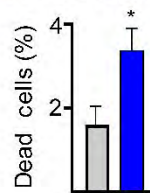
ns-dsRNAi



PIAS2b dsRNAi 1



■ ns-dsRNAi  
■ PIAS2b dsRNAi 1



Este tipo de vehículo permite que *in vivo* los dsRNAi sean estables a la degradación. Los complejos que forman con los dsRNAi protegen la degradación de los ácidos nucleicos por las nucleasas plasmáticas (Minakuchi et al, 2004). Se trataron 4 ratones con PIAS2b dsRNAi y 5 ratones con ns-dsRNAi. Terminado el tratamiento se esperó una semana y se procedió al sacrificio de los ratones y recogida de muestras (Fig IV.24-A).

Las curvas de evolución individuales de bioluminiscencia, obtenidas semanalmente por el IVIS, han sido ajustadas al 100% considerando este valor el dato obtenido en la semana 5, justo en el momento de comenzar el tratamiento en la que se comenzó el tratamiento, y se han comparado los valores que son significativos para la semana 9 (Fig IV.24-B).

Para la evaluación final de la respuesta final se usaron los criterios de análisis de crecimiento de cáncer en humanos RECIST (v1.1) (Eisenhauer et al, 2009), que calcula el tamaño tridimensional a partir de Tomografía Computerizada (TC) aplicados a nuestra bioluminiscencia en ratones (RECIST-like). Específicamente en RECIST se aplicaron los criterios para tumores en ganglios linfáticos, puesto que el tipo de lesión era semejante a lo detectado en nuestros ratones, y hay imposibilidad de calcular el volumen real de la lesión. También se han utilizado los criterios Choi, diseñados para detectar el crecimiento tumoral a partir de volúmenes obtenidos a partir de la intensidad de TC con contraste (Choi et al, 2004; Choi et al, 2007; Tirkes et al, 2013), aplicados a nuestra señal de bioluminiscencia en ratones (Choi-like). La medición *in vivo* de la reducción o crecimiento de un cáncer en respuesta al tratamiento es esencial a la hora de la evaluación de cada paciente y la decisión terapéutica de continuar o cambiar. Los criterios RECIST v1.1 son los admitidos como estándar; sin embargo, más recientemente se han puesto en discusión para los tumores que alteran primero su densidad antes de cambiar su tamaño, por ejemplo, cuando el tratamiento es un antiangiogénico, o porque las lesiones son pequeñas y la medición del tamaño es demasiado imprecisa. Frente a RECIST tenemos los Criterios Choi que miden cambios de densidad en el tumor mediante la atenuación de la señal ante un contraste o PET, y que es más precisa para tumores pequeños, y

parece que más sensible y correlaciona mejor con la respuesta clínica, al menos frente a inhibidores de quinasas que actúen como anti-angiogénicos (Fournier et al, 2017; Solis-Hernandez et al, 2019). Mantuvimos las categorías utilizadas en estas escalas para tumores humanos: PD= *Progressive disease*; SD= *Stable Disease*; PR= *Partial response*.

Según los criterios RECIST-like, mientras que el grupo control, ns-dsRNAi, los tumores siguieron creciendo progresivamente (PD) en el grupo tratado, PIAS2b dsRNAi, dos oPDX fueron capaces de estabilizar su crecimiento (SD) y uno redujo parcialmente su volumen (PR) (Fig IV.24-B). Según los criterios Choi, mientras que el grupo control, ns-dsRNAi, los tumores siguieron creciendo progresivamente (PD), en el grupo tratado, PIAS2b dsRNAi, un tumor oPDX estabilizó su tamaño (SD) mientras que dos redujeron parcialmente su volumen (PR) (Fig IV.24-B). En la figura IV.24-C se muestra imagen representativa de ambos grupos de ratones a punto final. El análisis estadístico de estos datos mostró diferencias significativas al final del tratamiento ( $p=0,01$ ).

También se han obtenido modelos de ajuste matemático para el ns-dsRNAi y PIAS2b dsRNAi usando el método LOWESS (Figura IV.24 B, curvas gruesas). Se puede ver como todos los tumores han crecido de forma igual hasta la semana 5 y una vez finalizado el experimento ver la diferencia de señal entre los ratones ns-dsRNAi y PIAS2 dsRNAi 1. En los controles, desde la primera semana de inicio de la formación del tumor hasta el final del tratamiento la señal de bioluminiscencia aumentó siempre mientras que en el tratado con PIAS2 dsRNAi 1 la señal fue manteniéndose.

En la figura IV.24-D, se muestran la comparación de valores de bioluminiscencia al final del tratamiento. A punto final, hay una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control de ratones ns-dsRNAi y PIAS2 dsRNAi 1.

En el punto final se realiza autopsia y extracción de los tumores. Se realiza una primera valoración *in situ* para determinar la afectación del crecimiento tumoral a otras regiones. En los ratones control se ve un crecimiento local agresivo, invasión y destrucción de estructuras anatómicas del cuello, que incluso afecta y desplaza a la mandíbula en



ocasiones, típico comportamiento de los carcinomas anaplásicos humanos. Se realiza un examen *ex vivo* de las dimensiones del tumor donde se observan diferencias a simple vista. Se observa que los tumores de los animales control, ns-dsRNAi son mayores que los ratones tratados con PIAS2 dsRNAi 1 (Fig IV.24-E). También se realiza un examen macroscópico de los órganos más susceptibles de metástasis como los pulmones, cerebro, corazón e hígado. En ninguno de los grupos aparecieron metástasis aparentes.

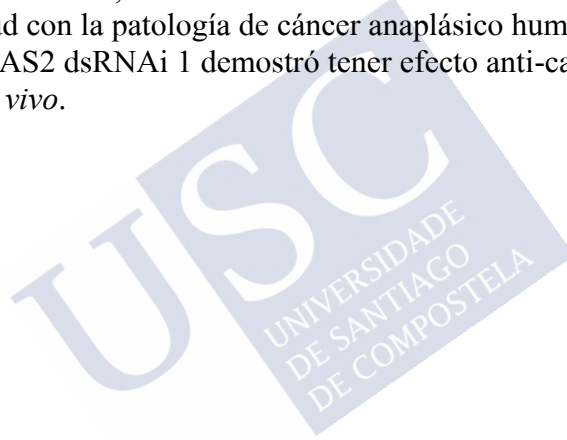
Los tumores fueron fijados, seccionados para posterior análisis histológico. Su volumen tridimensional fue calculado a partir de las secciones con la fórmula del volumen del elipsoide. Aunque no se alcanzó diferencia significativa en volumen de los tumores entre los dos grupos ( $p=0,1$ ), la media de los tumores de los ratones tratados con ns-dsRNAi es mayor que la de los tratados con PIAS2 dsRNAi 1 (Fig IV.24-F). Importante destacar que los carcinomas encontrados no se corresponden con un volumen regular ya que se extendían entre estructuras, y por tanto el volumen calculado por microscopía pudiese no corresponder bien al real.

Al comparar secciones de los cánceres tratados con PIAS2 dsRNAi 1 o ns-dsRNAi no encontramos diferencias desde el punto de vista patológico global en la tinción con hematoxilina-eosina, ni en las inmunohistoquímicas para Ki67, p53 o citokeratinas (Fig IV.24-G). Una observación difícil de cuantificar es que en los cánceres tratados con PIAS2 dsRNAi 1 se observaba un patrón menos cohesivo en muchos campos, aunque no en todos (comparar microfotografías con hematoxilina-eosina en la Figura 24-G). La evaluación automática de Ki67 con el programa de uso clínico, *Automated Cellular Imaging System* (ACIS III) no dio ninguna diferencia (Fig IV.24-H).

No existe ningún marcador inmunohistoquímico de catástrofe mitótica, y además estas células desaparecen de forma rápida. En la evaluación detallada a mayor aumento de las hematoxilinas, cuantificamos las células con apariencia de “muertas” que en patología clínica reflejan fragmentos de células muertas como “cuerpos apoptóticos” aunque su causa no sea exclusivamente la “apoptosis real de biología celular” ya que también se reconocen en enfermedades

autoinmunes, infecciones, enfermedad de injerto-contra huésped, etc. (Jiang et al, 2017; Xu et al, 2019). Estas células tienen su citoplasma eosinófilo rosado intenso, con un núcleo condensado y teñido hematoxilina intenso e incluso a veces fragmentado (Fig IV.24-I cabezas de flecha amarillas). El conteo asignó un punto amarillo a cada célula encontrada de estas características y un punto violeta a cada núcleo normal (Fig IV.24-I). En los carcinomas oPDX tratados con PIAS2 dsRNAi 1 se doblaron significativamente las células con estas características de células muertas con diferencias significativas (Fig IV.24-I abajo).

En resumen, nuestro modelo *in vivo* de oPDX es relevante por su similitud con la patología de cáncer anaplásico humano. Y, además, nuestro PIAS2 dsRNAi 1 demostró tener efecto anti-canceroso en este modelo *in vivo*.





## V. DISCUSIÓN





### ***V.1 La función de PIAS2. Visión histórica de las funciones propuestas para la familia PIAS co-activador / co-represor de la transcripción o E3 SUMO ligasa***

No hay mucha literatura científica sobre este gen concreto, que forma parte de una familia de cuatro genes junto con PIAS1, PIAS3 y PIAS4 (ver Apéndice 2: Árbol genético Evolutivo de PIAS, “*PIAS Genetic Tree*” obtenido a partir de datos de Ensembl). Además, en las bases de datos, desgraciadamente, hay algunas entradas que son incorrectas con respecto al gen PIAS2 debido a una confusión histórica. Esto es porque en enero de 1997 se describió en extractos embrionarios de ratón mediante el ensayo doble-híbrido (*yeast two-hybrid assay*), una proteína llamada Miz1 que interactuaba con el factor de transcripción Msx2 y contenía un *zinc finger*, a la cual se le llamó con el nombre de Miz1 (Wu et al, 1997). Esta proteína hoy sabemos que era Pias2b de ratón, pero la secuencia presentada en este trabajo empieza en el aminoácido 132 de la verdadera proteína, es decir era una secuencia parcial. A finales de ese año, en diciembre, se publica un artículo en Science describiendo PIAS3 a partir de librerías de cDNA de timo de ratón y humano (y PIAS1 como *in preparation*) como un miembro de una nueva familia PIAS, acrónimo de *Protein Inhibitor of Activated STAT*, que contiene un *Zinc finger* y regula la actividad transcripcional de STAT3, (mientras PIAS1 regularía la actividad de STAT1) (Chung et al, 1997). En 1999 ya se publica el homólogo de Miz1 y PIAS3 en *Drosophila Melanogaster* y le llaman Zimp.

Pero en paralelo y ajeno a estos descubrimientos, en septiembre de 1997, mediante un ensayo doble-híbrido en una librería de la línea celular humana HeLa en busca de proteínas que se unan a Myc, Martin Eilers clona Miz1, una proteína que contiene un zinc-finger y que interacciona con Myc (*Myc-interacting Zn finger protein-1*) e inhibe gran parte de sus acciones protumorales por oposición a Max (Peukert et al, 1997). Esta proteína se llama ahora ZBTB17, por *Zinc finger and BTB domain-containing protein 17*, y está también muy conservada en el reino animal (Uniprot, 2019; Q13105 ZBT17\_HUMAN).

A partir del momento de su clonación en 1997 la confusión entre estas dos proteínas distintas pero denominadas con el mismo acrónimo,

aunque de significados distintos, estaba servida. La situación se potenció por las dificultades de acceso a bases de datos y la reducida calidad de las mismas en sus comienzos. Esta confusión sigue hasta nuestros días, a pesar de las múltiples advertencias, correos y mensajes de los científicos afectados, y a la extensa revisión o “curación” de datos constante en la mayoría de las bases de datos. Buscando en PubMed con fecha de Julio de 2019 “PIAS2 AND Miz1 en día salen todavía diez artículos, de los cuales los cuatro más recientes fechados entre 2008-2011, y en revistas con rigor científico, se refieren a ZBTB17 y no a PIAS2 (Wanzel et al, 2008; Herold et al 2008; Saito et al, 2009; Pyndiah et al, 2011).

Históricamente pues, la primera función que se propuso para las proteínas de la familia PIAS, PIAS1-2-3-4, era ser factores reguladores de la transcripción, bien directamente bien en asociación con otros factores de transcripción. PIAS1 se publicó -por fin - en 1998 como un factor regulador inhibidor de la actividad transcripcional de STAT1 (Liu et al, 1998), tras PIAS3 que ya hemos comentado se había propuesto como represora de STAT3 (Chung et al, 1997). Por otra parte, se propone que PIAS1 sea un factor regulador activador de la actividad transcripcional del receptor de andrógenos en el testículo (Tan et al, 2000). Y PIAS2a (llamada en su momento ARIP3) se asociaba al receptor de glucocorticoides para incrementar su acción transcripcional de forma más eficiente que Miz1/PIAS2b (Kotaja et al, 2000). Sin embargo, todas las proteínas PIAS interaccionaban con los receptores de glucocorticoides, estrógenos, andrógenos y progesterona como co-activadores para potenciar su acción transcripcional (Moilanen et al, 1999; Kotaja et al, 2000; Kotaja et al 2002a). Se propone que, cuando se compara en iguales condiciones la potencia de todas las proteínas PIAS sobre los receptores de esteroides con la acción sobre STATs, ya que la cantidad de PIAS2 necesaria para regular receptores esteroideos es muchísimo menor que para regular STATs su verdadera función fisiológica podría ser la primera (Kotaja et al, 2000). A esta evidencia se sumaría el hecho de que se encuentra mayor expresión de PIAS (PIAS1, PIAS2a/ARIP3) en testículo que en otros órganos (Tan et al, 2000; Kotaja et al, 2002a).



En 2002 Kotaja et al proponen que PIAS2b y PIAS2a, PIAS1 y PIAS3 son E3-SUMO ligasas del receptor de andrógenos y del factor de transcripción c-Jun (Kotaja et al, 2002b). PIAS interaccionaría a su vez con UBC9/UBE2I, considerada como la E2 SUMO transferasa en este proceso. En la actualidad, esta es la función que ha permanecido, y las bases de datos resumen la función PIAS2 como un gen con múltiples isoformas con actividad enzimática SUMO E3 ligasa, SUMOiladora de sus proteínas diana. (Sayers et al, 2019; Entrez gene Summary Aug 2017, NCBI Sequence Database, National Institute of Health; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Isoformas concretas de PIAS2 aumentan la SUMOilación de proteínas diana específicas. Por ejemplo, PIAS2b SUMOila p53 y c-Jun en ensayos *in vitro*, tan bien como lo hace PIAS1 (Schmidt and Müller, 2002); PIAS2b SUMOila MDA5, RNA citosólico sensor de virus, para que logre inducir la producción de interferón (Fu et al, 2011); PIAS2a SUMOila PTEN, la fosfatasa de fosfatidil-inositol 3 fosfato, evitando que se ubiquitinice y aumentando su estabilidad (Wang et al, 2014); ambas isoformas PIAS2b y PIAS2a son capaces de SUMOilar el factor de transcripción hematopoyético FLI1 (van den Akker et al, 2005).

A partir de estos trabajos iniciales, se ha asumido como cierta la función molecular enzimática de PIAS2 como E3 SUMOilasa, y comienza una etapa de estudios más profundos en diversos sistemas fisiológicos y patológicos con el resultado de funciones celulares distintas y específicas de tipo celular. Bastantes de estos estudios utilizan las proteínas Flag-PIAS2b y Flag-PIAS2a (también llamadas Flag-PIASxb y Flag-PIASxa) (Wang et al, 2014), u otros constructos con otros *Tags*, como c-Myc-PIAS2 (Zheng et al, 2012) o la fusión EGFP-hPIAS2 (Galanty et al, 2009). De esta forma, no trabajan con las proteínas endógenas y por tanto no utilizan anticuerpos específicos para PIAS2 ya que utilizan anticuerpos anti-Tag.

La SUMOilación tiene como diana una amplia variedad de proteínas, incluidos los factores de transcripción, receptores de membrana y enzimas, y es esencial durante el desarrollo embrionario (Nacerddine et al, 2005; Flotho and Melchior, 2013). En los vertebrados, existen cinco genes SUMO (SUMO1–5). SUMO1–3 se expresa ubicuamente, mientras que SUMO4 y SUMO5 son más

específicos de tejido, y sus funciones no están completamente definidas (Flotho and Melchior, 2013; Liang et al, 2016). De hecho, tiroides es uno de los tejidos donde la expresión de SUMO4 es abundante (Uhlen et al, 2017; HPA [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). Por otra parte, SUMO5 es el único SUMO que se localiza en cuerpos nucleares del tipo PML (*Promyelocytic leukemia nuclear bodies*, PML-NBs) (Liang et al, 2016).

Las modificaciones de SUMO se pueden dividir en mono, poli y multi-SUMOilación (Flotho and Melchior, 2013; Hendriks et al, 2016). Aunque al principio se pensaba que la SUMOilación era un mecanismo para señalar proteínas para su degradación, complementario a o competidor con la ubiquitinización, hay una evidencia creciente que asocia la SUMOilación con la regulación de múltiples procesos celulares, incluida la meiosis y la mitosis regulando función de proteínas y no su degradación (de Carvalho et al, 2006; Dasso et al, 2008; Zhao, 2018).

La cadena de SUMOilación comienza con las proteasas específicas de la sentrina (SENP) que catalizan la maduración de las proteínas SUMO que se transfieren al sustrato final a través de una cascada enzimática que comprende la enzima activadora E1 (SAE1/Uba2) (Rabellino et al, 2017). Después sigue con la enzima conjugadora E2 (Ubc9) y termina con unas pocas enzimas E3 ligasa de SUMO, entre las que se encuentran PIAS2 dentro de la familia PIAS (Rabellino, 2017).

En humanos hay 15 E3 SUMO ligasas descubiertas hasta ahora (Uniprot, 2019; <https://www.uniprot.org/uniprot>). No específicas para un SUMO concreto están las cuatro PIAS (PIAS1-4) que pueden conjugarse SUMO1, SUMO2/3 o SUMO5, y los dos genes ZMIZ1 y ZMIZ2 que pertenecen a la misma familia de genes paralogos (véase Apéndice 2); RANBP2, que puede conjugarse SUMO1 o SUMO2 y relacionada con importación/exportación al núcleo; NSMCE2 relacionada con respuesta al daño en DNA modificando el complejo SMC5/6; TRIM28 considerado un represor en asociación con las proteínas KRAB; RNF212 relacionada con el *crossing-over* o entrecruzamientos en meiosis, MUL1 una doble ubiquitin/SUMO ligasa

mitocondrial relacionada con mitofagia. Específicas de SUMO1 están CBX4, del grupo Polycomb; EGR2 relacionada con los genes HOXA4. Específicas de SUMO2/3 están ZNF451 relacionada con daño en DNA y SUMOilación de MCM4; y KIAA1586 muy expresada en riñón y de función desconocida.

De esas enzimas hay dos que son específicos de vertebrados sin homólogos en levaduras. CBX4/Pc2, la proteína del grupo polycomb (Kagey et al, 2003), y RanBP2, una proteína del complejo grande de poro nuclear (NPC) que se localiza en la cara citoplásmica del poro (Pichler et al, 2002).

PIAS2 interactúa con varias proteínas que detallaremos a continuación en los siguientes párrafos. Pero, además, por similitud estructural, se considera que también interactúa con GTF2I, GTF2IRD1, IKFZ1, DAB2 de las que no hay trabajos todavía (Uniprot, 2019; <https://www.uniprot.org/uniprot>).

Sin embargo, las funciones de las proteínas PIAS no siempre están estrictamente asociadas con su actividad de la ligasa E3 de SUMO, ya que en algunos casos la mutación del dominio RING sigue conservando la función de PIAS sobre una proteína concreta, mientras la alteración del dominio SAP elimina la acción de PIAS (Rabellino et al, 2017).

Según la base datos ATLAS (Uhlen et al, 2017; [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)), el tejido en humano donde más PIAS2 se expresa es en testículo con gran diferencia, seguido por cerebro y tiroides. Pias2 también se expresa muy abundantemente en el testículo de roedores (Yan et al, 2003).

Hay un modelo de ratón *knockout* para Pias2 modificado a partir del exón 3 (Santti et al, 2005). Los ratones *-/-* se desarrollan normalmente y son fértiles, no presentan alteraciones hormonales del eje reproductor y tienen una espermatogénesis cualitativamente normal. Sin embargo, sus recuentos de espermatozoides son reducidos y presentan una alta tasa de apoptosis en sus túbulos seminíferos, además de expresión aumentada de transcritos dependientes del receptor de andrógenos en comparación con los ratones *wild type* (Santti et al,

2005). El consorcio IMPC (Dickinson et al, 2016; *International Mouse Phenotypic Consortium*, <https://www.mousephenotype.org>) ha generado por “gene-trapping” otros dos modelos, de Pias2 *knockout* modificadas a partir del exón 7 con varias líneas en cada uno (Pias2tm1a(KOMP)Wtsi y Pias2Gt(pT1Betageo)1Ruiz). Los ratones homocigotos de estos modelos también son viables y fértiles, aunque son significativamente más pequeños y alguna de las líneas tienen alteraciones óseas en los dedos, y otras un comportamiento social anormal.

### **V.1.1 Papel de PIAS2 como regulador transcripcional en transducción de señales**

La mayor parte de los trabajos sobre PIAS2 describen su actuación como regulador transcripcional. PIAS2 es un co-represor para p53 y c-Jun en células HeLa, (Schmidt and Müller, 2002) algo que veremos con más detalle en siguientes capítulos de la discusión. También se ha descrito como co-represor de los receptores esteroideos, sobre todo el receptor de andrógenos, como se ha explicado más arriba (Moilanen et al, 1999; Nishida and Yasuda, 2002; Kotaja et al, 2002a).

PIAS2 es un co-represor de PPAR- $\gamma$  de forma independiente del ligando en células HepG2 (Ohshima et al, 2004). La apoptosis inducida por el ligando de PPAR- $\gamma$  aumenta con el mutante PPAR- $\gamma$  para la SUMOilación.

PIAS2a promueve fuertemente la SUMOilación de SF-1 (Factor esteroideogénico 1 o NR5A1) reprimiéndolo (Lee et al, 2005).

KLF3/ BKLf es un factor de transcripción *zinc finger* que se sabe que funciona como un potente represor transcripcional. La SUMOilación de KLF3 por PIAS2 no afecta su unión al DNA, pero la mutación de los sitios de SUMOilación reduce su actividad de represión transcripcional (Perdomo et al, 2005). PIAS2a también SUMOila KLF8 inhibiendo su actividad, tanto como factor activador transcripcional como factor represor transcripcional, resultando en bloqueo del ciclo celular en G1(Wei et al, 2006).

El proto-oncogen PLAG1, un factor de transcripción *zinc finger*, es SUMOilado por PIAS2a reprimiendo su capacidad de transactivación (Van Dyck et al, 2004). También el factor FLI-1 es SUMOilado por PIAS2a lo que reprime su actividad (van den Akker et al, 2005).

Sin embargo, PIAS2 también puede ejercer funciones como co-activador transcripcional. Entre las proteínas cuya SUMOilación por PIAS2 potencia su acción están: el coactivador NCOA2/ Grip1, necesario para la actividad de los receptores esteroideos que se SUMOila por PIAS2a (Kotaja et al, 2002b); la DNMT3A (*de novo DNA methyltransferase*), una DNA metiltransferasa que tiene un papel importante en el desarrollo embrionario participando en el *imprinting* genómico y silenciamiento transcripcional, que se SUMOila por PIAS2a (Ling et al, 2004); AXIN, proteína implicada en la vía de Wnt destruyendo beta-catenina y también implicada en la ruta JNK/SAPK, considerada como un supresor de tumores. Su SUMOilación por PIAS2b lleva a la activación de JNK, sin afectar la vía Wnt (Rui et al, 2002).

PIAS2b conjuga SUMO a MDM2, probablemente en asociación con PIAS1 (Miyauchi et al, 2002). La SUMOilación de MDM2 no sólo estaría relacionada con su actividad, sino con su localización ya que se necesita para su translocación del citoplasma al núcleo en una lisina de la señal de localización nuclear (NLS) (Miyauchi et al, 2002).

Otros trabajos más recientes, utilizando también la técnica de doble-híbrido, relacionan PIAS2b con la chaperona co-reguladora transcripcional UXT (*ubiquitously expressed transcript o androgen receptor trapped clone-27*), que regula el receptor de andrógenos y NF-KB (Kong et al, 2015).

La Pold2 (*DNA polymerase delta subunit 2*), relacionada con la replicación y reparación del DNA esta descrita como un *partner* de PIAS2 interactuando directamente uno con el otro (Zheng et al, 2012).

PIAS2 interactúa con proteínas como HDAC3, donde PIAS2b desactiva la represión transcripcional por HDAC3 (Tussié-Luna et al, 2002). Las HDACs tienen un papel importante en la regulación de la

transcripción de genes, a través de la modificación de la cromatina ya que son enzimas que catalizan la eliminación de grupos acetilo de los residuos de lisina de proteínas de la cromatina, tanto en proteínas histonas como no histonas.

Más compleja es la acción de PIAS2 sobre la vía MAPK y su factor de transcripción ELK1. En el estado basal, ELK1 es inactivo en la cromatina por el reclutamiento de histonas deacetilasas (HDAC) dependientes de SUMO. PIAS2a se une a ELK1 y aumenta su actividad transcripcional (Yang et al, 2005). Esta acción es independiente de la actividad SUMOilasa de PIAS2a pero necesita la capacidad de unir SUMO de ELK1. Es decir, cuando se activa la vía de ERK PIAS2a funciona como un coactivador para facilitar la eliminación de SUMO y HDAC2 de ELK1, promoviendo proliferación (Yang et al, 2006). Sin embargo, cuando se activa la vía de estrés JNK/p38MAPK, PIAS2 se fosforila en Ser113, Ser116 e inhibe la pérdida de HDAC2 y SUMO en ELK1, actuando como co-represor (Yang et al, 2006). En un estudio reciente, en las células HeLa sometidas a estrés térmico, la fosforilación de PIAS2 y la SUMOilación de ELK1 dependientes de la vía p38MAPK se correlacionan con la inhibición de la transactivación por ELK1 (Chowdhury et al, 2019).

### **V.1.2 Papel de PIAS2 en regulación del sistema inmune y defensa anti-viral.**

Las citoquinas regulan las funciones de las células inmunes por modificaciones transcripcionales para aumentar o disminuir la expresión de determinados genes. Los STATs y el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) son importantes factores de transcripción que actúan en la vía de las citoquinas para la regulación de la expresión génica. PIAS2b reprime transcripcionalmente la actividad de STAT1 y PIAS2 la de STAT4 reclutando otros co-represores moleculares como los HDACs (Arora et al, 2003; Ungureanu et al, 2003; Rogers et al, 2003; Ungureanu et al, 2005). Esta función de PIAS2 sobre STAT1 y STAT4 sería aparentemente independiente de su actividad SUMOiladora.



También relacionado con el sistema inmune, está descrito que PIAS2b es una SUMO E3 ligasa para la kinasa PKC- $\theta$  (Wang et al, 2015). El análisis en cultivos primarios de células T de ratón y humanas reveló que la SUMOilación de PKC- $\theta$  era esencial para la activación de las células T.

Los procesos inflamatorios y la señalización de andrógenos son críticos para el crecimiento del cáncer de próstata (PC). Para entender la importancia se estudió la interacción entre el receptor de andrógenos (AR) y la vía NF- $\kappa$ B. PIAS2 junto con PIAS1y FOXA1 contribuyen al cáncer exponiendo los sitios de unión a cromatina de NF- $\kappa$ B y enmascarando los sitios de unión a la cromatina de AR (Malinen et al, 2017).

PIAS2 ha sido descrita como una SUMO E3-ligasa para proteínas virales como el oncogen E1 de papilomavirus (Rosas-Acosta et al, 2005). E1 una helicasa de unión a origen codificada por papilomavirus (PV) esencial para la replicación del DNA de PV, que es modificada post-traduccionalmente por SUMOilación. No se ha determinado la importancia funcional de la SUMOilación mediada por PIAS2 de E1.

Se ha encontrado mediante un ensayo doble híbrido (*yeast two-hybrid assay*) que PIAS2b y PIAS2a son *partners* de unión a Rta (Liu et al, 2006). La proteína Rta (*replication and transcription activator*) del virus Epstein-Barr (EBV) activa el ciclo viral lítico. Las interacciones entre Rta y PIAS2 inducen la SUMOilación de Rta por PIAS2b, lo que aumenta la capacidad transactivadora de Rta sobre su propio promotor y los promotores de otras proteínas virales como BNLF1 o promotores regulados por E2F como p21CDKN2A (Liu et al, 2006).

El sensor anti-virus RNA IFIH1/MDA5 también es SUMOilado por PIAS2b potenciando su acción en la inducción de interferón, como se ha demostrado sobreexpresando ambas proteínas en las líneas celulares HeLa y A549 (Fu et al, 2011). Esto podría tener importancia en la respuesta a las infecciones virales mediada por MDA5.



### V.1.3 Papel de PIAS2 en el sistema nervioso.

PIAS2a interactúa con PARK7/DJ-1 la glicasa de proteínas y ácidos nucleicos (Takahashi et al, 2001; Shinbo et al, 2006). Por una parte, la SUMOilación de PARK7 previene su agregación y localización mitocondrial (Shinbo et al, 2006), pero por otra, PARK7 previene el efecto represor de PIAS2 sobre el receptor de andrógenos (Takahashi et al, 2001).

La acumulación de  $\alpha$ -sinucleína es un indicador o *hallmark* patológico de la enfermedad de Parkinson. La  $\alpha$ -sinucleína ubiquitinada se degrada en proteasomas o lisosomas. Se ha identificado la SUMOilación como un mecanismo importante que contrarresta la ubiquitinación por diferentes E3 ubiquitin ligasas y regula la degradación de la  $\alpha$ -sinucleína. PIAS2 promueve la SUMOilación de  $\alpha$ -sinucleína, llevando a una disminución de su ubiquitinación y causando su acumulación y agregación en inclusiones (Rott et al, 2017). Mutantes de  $\alpha$ -sinucleína de pacientes con enfermedad de parkinson están más SUMOilados que la proteína *wild type*, así que la SUMOilación de  $\alpha$ -sinucleína pueden ser una diana terapéutica cuyo bloqueo permita para reducir los niveles de  $\alpha$ -sinucleína y posiblemente la agregación en parkinson.

Recientemente se ha encontrado una baja expresión de PIAS2 y otras enzimas de la vía de SUMOilación y ubiquitinación en tejidos *post mortem* de pacientes con esquizofrenia, y en modelos animales de la misma enfermedad (Andrews et al, 2017).

### V.1.4 Los otros miembros de la familia PIAS: PIAS1, PIAS3 y PIAS4

Todos los miembros de la familia PIAS interaccionan con facilidad *in vitro*. No está tan bien estudiado si esto es cierto *in vivo*, ya que no todos se expresan con la misma intensidad en los distintos tejidos.

Los miembros de la familia PIAS, sobre todo PIAS1 y PIAS4, regulan la localización de actores de transcripción dentro del núcleo

pasando a una localización en “speckles” o localizándose en la matriz (Tan et al, 2002; Rytinki et al, 2009). En esta relocalización, algunas veces el dominio SAP tendría más importancia que el dominio SIM, y la actividad enzimática de SUMOilación no sería clave. Factores de transcripción donde se ha demostrado una relocalización dependiente de PIAS1 incluyen p53, 73, los receptores nucleares de hormonas esteroideas y PPAR $\gamma$  (revisado en Rytinki et al, 2009). Factores de transcripción donde se haya demostrado relocalización dependiente de PIAS4 incluyen LEF1, cEBP $\delta$  y OCT4 (revisado en Rytinki et al, 2009). También la regulación de Fli-1 por PIAS2a parece más dependiente de relocalización que de SUMOilación (van der Akker, 2009).

PIAS1 y PIAS4, pero no PIAS2 y PIAS3, promueven la reparación de daños en el DNA como respuesta a las roturas de doble cadena del DNA (Galanty et al, 2009). De la misma forma, PIAS1 y PIAS4, pero no PIAS2 ni PIAS3, regulan la actividad BRCA1 tras tratamiento con hidroximetilurea, considerada un estrés genotóxico (Morris et al, 2009). Estas SUMOilasas son reclutadas a los sitios de daño junto a BRCA1 y a la E2 SUMO-ligasa Ubc9, y al SUMOilar BRCA1 aumentan su eficacia Como ubiquitin ligasa (Morris et al 2009).

De forma consistente en la literatura se ha asociado PIAS1 y PIAS3 con la regulación de NF- $\kappa$ B. PIAS1 y PIAS3 suprimen la transcripción mediada por NF- $\kappa$ B al interactuar con la subunidad p65/RelA (Liu et al, 2005; Jang et al, 2004).

A nivel de organismo modelo, los miembros de PIAS están relacionados en el desarrollo embrionario al igual que Ubc9, cuya delección es deletérea para el embrión de ratón con anomalías severas en la estructura nuclear y alteración de la segregación de cromosomas (Nacerddine et al 2005).

Pias1 está descrito como un gen esencial para la eritropoyesis del saco vitelino y vasculogénesis en embriones de ratón (Constanzo et al, 2016). PIAS1 regula la autorrenovación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas (Liu et al, 2014); la respuesta inmune innata y adaptativa, PIAS1 restringe la diferenciación de las células *regulatory T* (Treg) al mantener un estado represivo de la cromatina a

nivel del promotor Foxp3 (Liu et al, 2010) y la memoria a largo plazo, La inhibición de PIAS1 en el hipocampo de ratas afecta el aprendizaje y memoria a largo plazo (Tai et al, 2011).

Pias3 no es letal embrionario y el ratón sólo presenta déficits funcionales en la retina (Campla et al, 2017).

Pias4 no es letal embrionario, y los ratones se desarrollan con normalidad, con reducida mortalidad perinatal o postnatal (Wong et al, 2004). Tampoco tiene un marcado fenotipo relacionado con el sistema inmune, por lo que parece que en ratones su función puede ser compensada por otros miembros de la familia (Roth et al, 2004).

## ***V.2 Dificultades en el estudio de las isoformas de mRNA y proteína PIAS2***

Uno de los aspectos técnicos problemáticos que nos encontramos frecuentemente al revisar la bibliografía sobre PIAS2, es la ausencia total de validación de los anticuerpos, la falta de marcadores en las bandas de western, el uso exclusivo de proteínas exógenas asociadas a un *Tag* y transfectadas sin estudiar las proteínas endógena, o una única validación en las casas comerciales exclusivamente mediante sobreexpresión de alguna de las isoformas de la proteína, sin atender a los niveles endógenos o la detección en secciones de tejidos (inmunohistoquímica) /células (inmunocitoquímica).

En nuestros experimentos, ante tantas isoformas de mRNA de PIAS2, decidimos que para empezar a hacer estudios funcionales fiables primero tendríamos que validar los anticuerpos para PIAS2. Para la validación y caracterización de los anticuerpos se sobreexpresaron los plásmidos Flag-hPIAS2b y Flag-hPIAS2a con un *Tag* FLAG N-terminal (Arora et al, 2003) y el plásmido EGFP-hPIAS2b (Galanty et al, 2009) con sus respectivos controles en los mismos vectores sin PIAS2, y comparando con extractos sin transfectar pero que sabíamos que eran positivos para la expresión del gen por detección de su mRNA. Se utilizaron las líneas celulares CAL-62 y 8305C. Se hizo *western blot* como técnica discriminatória inicial (ver Tabla III.26). Como técnicas posteriores se hicieron

inmunocitoquímica, inmunohistoquímica en parafina y en criosecciones, e inmunoprecipitaciones (Fig IV. 5).

Se probaron hasta siete anticuerpos distintos en western, pero solamente dos podían reconocer PIAS2 exógenamente transfectado como Flag-hPIAS2: el anticuerpo monoclonal de ratón, mPIAS2 y el policlonal de conejo rPIAS2 (ver Tabla III. 26).

El anticuerpo mPIAS2, monoclonal de ratón anti-PIAS2, reconoce las dos isoformas proteicas Flag-hPIAS2 beta y alfa pues su epítipo, aunque es C-terminal, está situado en una secuencia común a ambas isoformas; también reconoce muy bien la proteína transfectada EGFP-hPIAS2b. Esta sobreexpresión también es reconocida en inmunofluorescencia en células como muestra la coincidencia de señal para EGFP y mPIAS2. En cuanto a la proteína endógena, detecta tres bandas de proteína endógena por *western blot* de diferente peso molecular: p75 kDa, p95 kDa y p140 kDa, con una banda más a p55 kDa. La banda que detecta más intensamente es p75.

Nuestra conclusión para mPIAS2 es que las células CAL-62 y 8305C no expresan la proteína PIAS2a puesto que no hay ninguna banda endógena que coincida con la sobreexpresada de esta isoforma (peso teórico de PIAS2a 63,2 kDa). Por otra parte, la banda mejor detectada asumimos que es PIAS2b, p75PIAS2b, puesto que coincide en peso con la sobreexpresada de esta isoforma, y este peso es equivalente al teórico propuesto para PIAS2b (68,2 kDa). p55PIAS2b interpretamos que es un fragmento procesado un PIAS2b mayor, ya que difiere demasiado para ser la tercera isoforma de PIAS2, llamada PIAS2-NY y con peso teórico de 45 kDa. Las bandas de 95 y 140 kDa interpretamos que son bandas de PIAS2b modificadas de alguna forma que, de forma relativa y necesitando mayor exposición, son todavía reconocidas por mPIAS2. Una de las razones por las que pensamos esto es que la intensidad de esas bandas aumenta cuando se transfecta cualquiera de las isoformas. En inmunofluorescencia, mPIAS2 da una tinción nuclear clara, aunque no intensa, en células en interfase. Este anticuerpo no funciona en inmunohistoquímica de tejidos parafinados, pero sí en criosecciones.

El anticuerpo rPIAS2, policlonal de conejo anti-PIAS2 tiene el epítipo en la zona C-terminal en la secuencia no común de la isoforma beta, y por tanto sólo puede reconocer la isoforma beta. En extractos de células sin transfectar, que corresponde a la proteína endógena, este anticuerpo reconoce de forma muy sensible una única banda en *western blot* de p95 kD un peso muy superior al teórico para PIAS2b (68,2 kDa) y superior también a p70PIAS2b reconocido por mPIAS2. rPIAS2 sólo reconoce las proteínas exógenas cuando se carga mucha cantidad de proteína por calle en los westerns blot, a pesar de lo cual reconoce Flag-hPIAS2b y EGFP-hPIAS2b cada una en su peso correcto.

Nuestra conclusión para rPIAS2 es que alguna modificación tiene p95PIAS2b que hace posible que sea reconocida por rPIAS2, mientras que la proteína transfectada Flag-hPIAS2b sólo está parcialmente modificada y no puede ser bien reconocida. Este anticuerpo detecta en inmunofluorescencia la proteína endógena de forma muy intensa localizada a nivel nuclear, y reconoce también la proteína EGFP-hPIAS2b exógena en inmunofluorescencia en el núcleo de las células. Es muy específica para la tinción nuclear en inmunohistoquímica de secciones parafinadas.

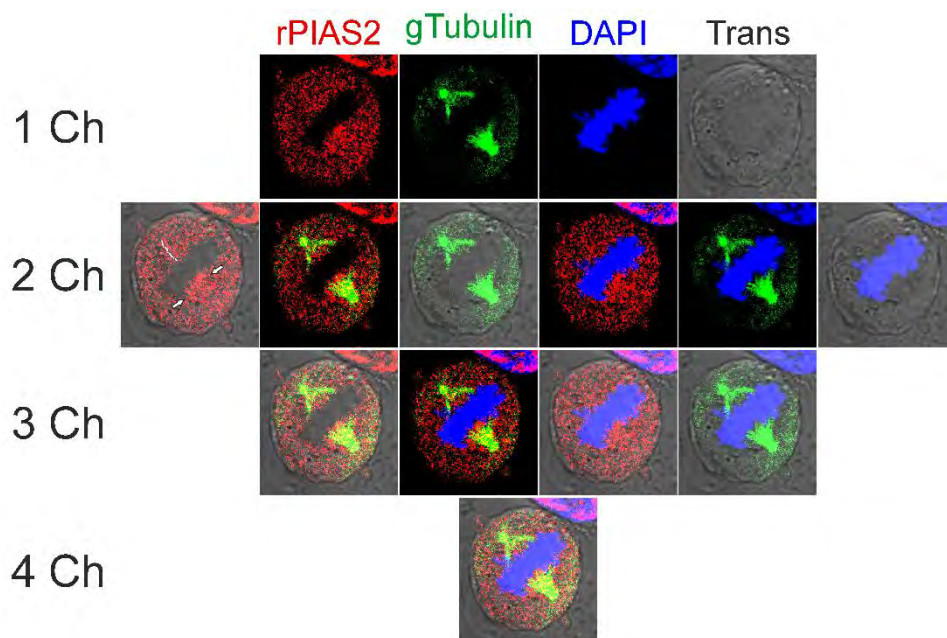
Ambos anticuerpos, mPIAS2 y rPIAS2 son capaces de inmunoprecipitar las proteínas endógenas, pero sólo mPIAS2 inmunoprecipita las proteínas exógenas transfectadas.

PIAS2b tiene en la parte C-terminal un dominio importante, el Dominio Carboxiterminal-Rico en Serina (Ser-rich Domain) aa. 571-612, en cuyo interior tiene un subdominio con una serie de siete serinas seguidas (Poly-S) (Shuai and Liu, 2005). Nuestros resultados sugieren que el anticuerpo rPIAS2 reconoce la cola de serinas fosforilada, y no reconoce la proteína sin fosforilar. Eso explicaría el peso más elevado y el pobre reconocimiento de las proteínas exógenas en el western, que por alguna razón no estén más que parcialmente fosforiladas. Nuestra hipótesis se confirma con el experimento de extractos tratados con fosfatasa lambda, donde se observa una reducción marcada de la señal dada por rPIAS2 en *western blot*.

Nuestros resultados en inmunofluorescencia de células en mitosis sugieren que PIAS2b necesita desfosforilarse al salir del núcleo

y participar en la mitosis, ya que el anticuerpo mPIAS2 da una señal mucho más intensa en mitosis que el rPIAS2, al contrario de lo que pasa en interfase. De todas formas, analizando con más detalle las inmunofluorescencias de células en mitosis con rPIAS2 observamos que, además de la tinción difusa y abundante por toda la célula (que creemos que corresponde a PIAS2b fosforilada), hay una fracción de tinción que, en vez de ser difusa, está localizada en el huso mitótico en los lugares donde se tiñe habitualmente con mPIAS2 (Figura V.1).





**Figura V.1** Metafase de una célula 8305C en mitosis (ampliación de la Foto mostrada en Resultados, Figura IV.18). En la línea superior se muestran los 4 canales (Ch) recogidos (rPIAS2 rojo, gTubulina verde, DAPI azul, luz transiluminada Trans escala de grises). En las siguientes líneas de fotos hacia abajo se muestran la mezcla de 2, 3 o los 4 canales. En rPIAS2+Trans se indica con flechas y línea blanca la fracción de tinción localizada y no difusa.

### ***V.3 PIAS2 en carcinoma diferenciado papilar de tiroides: un marcador pronóstico con una función –no esencial- en interfase***

Muchos estudios en cáncer se han hecho en células cancerosas creciendo *in vitro*. Desafortunadamente, muchos resultados obtenidos *in vitro* no han tenido ninguna relevancia o no han sido reproducidos en los pacientes. Esto es debido en parte a que el crecimiento *in vitro* es una variable en sí misma, independiente de la naturaleza normal o cancerosa de las células cultivadas.



Sin embargo, en tejidos endocrinos existía un problema técnico. Las células epiteliales endocrinas normales, células altamente diferenciadas y especializadas, no crecían *in vitro*. Es por eso que se generaron líneas celulares normales “artificiales” tras la expresión de un oncogen que permitía que crecieran *in vitro*. Por ejemplo, en tiroides se utiliza la línea Nthy-Ori-3-1 generada tras transfección de un cultivo primario de tiroides de mujer de 35 años con un genoma del virus SV-40, defectivo en el origen de replicación (SV-ori) (Lemoine et al, 1989). A pesar de la presencia de antígeno T largo y corto, demostrados oncogenes, se sigue considerando a esta línea como “tiroides normal” y muchísimos estudios de cáncer la utilizan como control. Sin embargo, se ha visto que, por ejemplo, tiene poblaciones tri-/tetraploides conviviendo con las diploides y que tiene casi un 6% de figuras mitóticas con retraso (*lagging*) en anafase-telofase (Maric et al, 2011).

El objetivo de nuestro grupo desde hace años es encontrar mecanismos y *pathways* específicos característicos de las células de cáncer de tiroides. Para ello diseñamos y estandarizamos un medio de cultivo que permitiese crecer a las células normales y benignas, el medio h7H (Bravo et al, 2013). Sabemos que este medio también funciona para células de adenoma hipofisario (Chenlo et al, 2019). Conseguimos, por tanto, evitar el tener que usar oncogenes para crecer epitelio normal endocrino.

Al crecer en paralelo, e incluso del mismo paciente, las células normales y cancerosas eliminamos la variable “crecer en cultivo”. Todos los cultivos están caracterizados, por qRT-PCR, western e inmunofluorescencia, para la expresión de marcadores fenotípicos de tiroides (NKX2-1/ TTF1-, PAX8, TSHR, TG, NIS y TPO), que son mantenidos tras varios pases (Bravo et al 2013). Nuestros cultivos normales/benignos secretan tiroglobulina y hormonas al medio de cultivo (Bravo et al, 2013). También se hace el genotipado, mediante identificación por STRs siguiendo las normas de ICLAC (Capes-Davis et al, 2010; <https://iclac.org/>), para comprobar que el cultivo obtenido coincide con el tejido de origen (Bravo et al 2013). También estudiamos a las alteraciones genéticas más frecuentes en tiroides (reordenamiento RET/PTC1, mutación T1766A de BRAF) (Bravo et al 2013).

Nuestro medio de cultivo permite que nuestros cultivos sean un buen modelo para obtener mecanismos o dianas terapéuticas no conocidas para el carcinoma de tiroides humano. Por ejemplo, hemos entendido cómo las células de carcinoma diferenciado de tiroides papilar son capaces de resistir la acción apoptótica del factor TGF $\beta$ , abundantemente secretado en epitelio de tiroides normal y canceroso (Garcia-Rendueles et al, 2017). En las células normales, TGF $\beta$  induce p15 y Bax y mueren; en las células cancerosas, con altos niveles de p27, se bloquea la inducción de Bax, y la célula resiste a la apoptosis induciendo Ciclina D1, a través de NF $\kappa$ B, y proliferando (Garcia-Rendueles et al 2017). Nuestros resultados in vitro fueron directamente corroborados en muestras de pacientes de forma clara y significativa.

Con estos buenos resultados iniciales, empezamos por hacer un estudio de proteómica global donde compararon cultivos benignos frente a cultivos de carcinomas diferenciados de tiroides. El objetivo era identificar proteínas expresadas diferencialmente. La técnica de tinción con nitrato de plata se encuentra obsoleta en nuestros días, y se reemplaza por métodos fluorescentes, debido a su variabilidad interensayo y que se ve afectada por factores como la temperatura y tiempo de revelado (Deracinois et al, 2013). Otro de los problemas es que debe hacerse con un protocolo cuidado para evitar el ligado de proteínas y su insolubilidad que las hace incompatibles con el espectrómetro de masas (Deracinois et al, 2013). Nuestro protocolo había sido validado previamente en el laboratorio, y para evitar variaciones todos los geles fueron corridos y teñidos juntos (Bravo et al, 2011).

Identificamos proteínas comunes de citoesqueleto como cateninas, tubulina beta, proteínas mitocondriales y chaperonas HSP, proteínas del proteasoma, y cristalina, una proteína relativamente abundante en células endocrinas y tiroides, aunque en la isoforma B (Uhlen et al, 2015; HPA [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). También identificamos Peroxiredoxina 2, proteína antioxidante que se expresa abundantemente en tiroides (Uhlen et al, 2015; HPA [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)), ya que es un tejido muy rico funcionalmente en reacciones redox para la síntesis de hormonas tiroideas.

Una vez asegurada la identificación de proteínas comunes, pasamos a analizar las diferencialmente expresadas, siendo muy estrictos en la cuantificación y la estadística. Se utilizaron dos softwares distintos para confirmar los resultados, PDQuest y SameSpots. Encontramos 8 spots significativamente aumentados en cáncer de los cuales pudimos identificar cuatro. Vimentina, VCP y Beta-actin eran proteínas abundantemente expresadas en cáncer de tiroides (Uhlen et al, 2015; HPA [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)).

La proteína PIAS2 no se había descrito hasta el momento en cáncer de tiroides, y ni siquiera se sabía el papel que podría tener en esta patología. Realizamos un análisis *in silico* de los datos de expresión de RNA para los cánceres humanos del consorcio TCGA (The Cancer Genome Atlas, <https://portal.gdc.cancer.gov/>) expuestos en HPA (Uhlen et al, 2017; HPA [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). Como se puede observar en la Imagen V.1, la expresión de PIAS2 esta aumentada en los carcinomas diferenciados de tiroides.

La presencia de más de 2,05FPKM es un factor muy significativo de mal pronóstico en cáncer de tiroides diferenciado con una supervivencia de 80% frente a 98% a los 5 años, o de 60% frente a 98% a 10 años. Aunque no había diferencias en el resultado incluyendo casos de Estadío IV, nuestro análisis se centró en los casos de Estadíos I-II-III para asegurar que se refería a carcinomas diferenciados de tiroides, ya que los carcinomas anaplásicos (o indiferenciados) son directamente estadío IV.

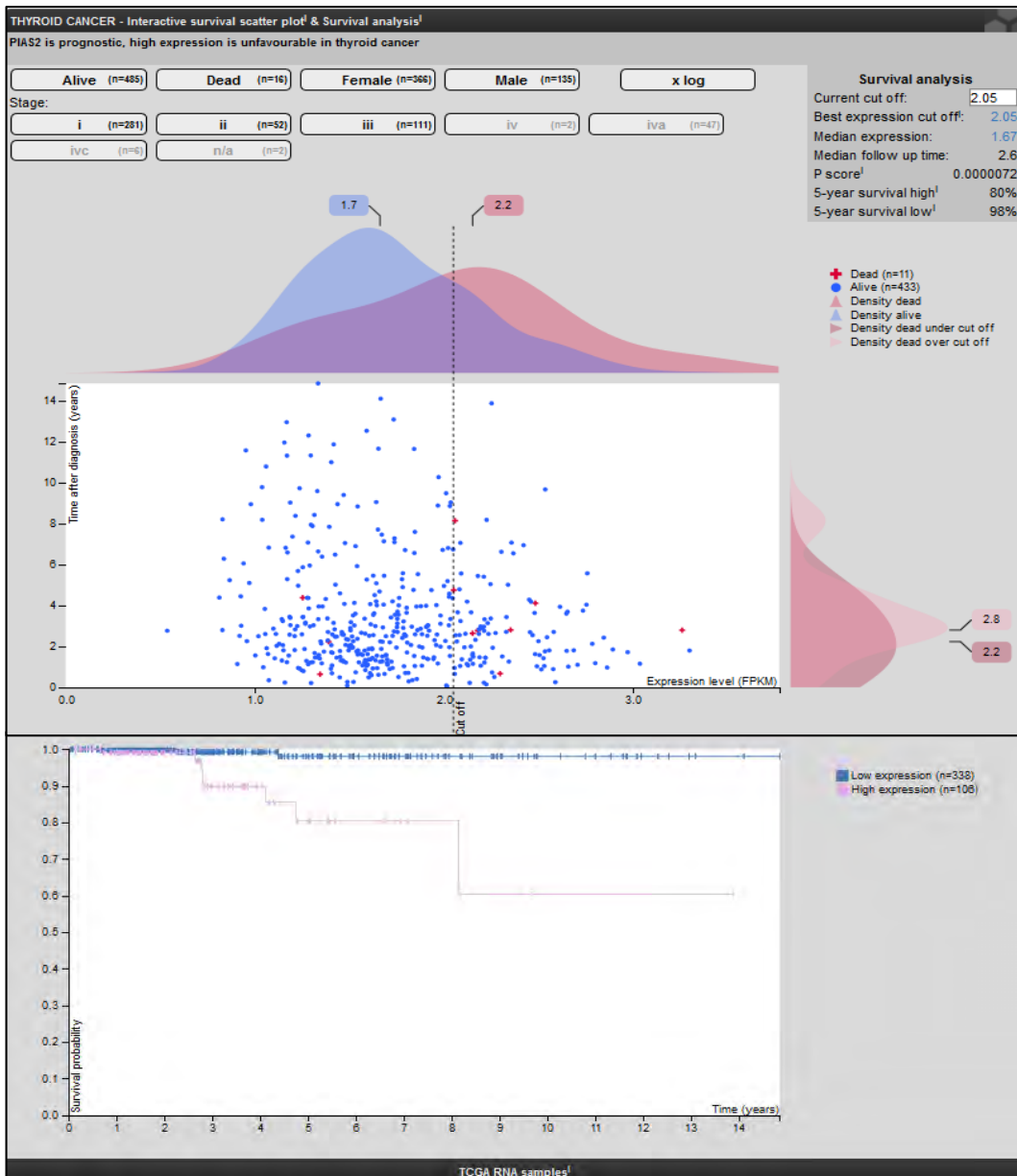
Este dato tiene todavía más valor si se pone en el contexto de los demás cánceres (Tabla V.1). Los cánceres se dividen en tres grupos. En medio está el grupo en donde la expresión de PIAS2 no tiene ninguna relevancia en el pronóstico del cáncer, como Melanomas, Cáncer de cérvix, próstata, testículo, riñón, urotelio, gliomas y el cáncer colorrectal, estómago y cabeza y cuello de todos los estadíos.

PIAS2 es un factor potente de peor supervivencia en cáncer de tiroides, especialmente en estadíos I-III. Aunque menos relevante también es significativo como factor de peor pronóstico en cáncer de hígado, endometrio y colorrectal estadíos I-III.

PIAS2 es un factor potente de mejor supervivencia en carcinoma de páncreas, ovario y mama. También significativo, pero menos relevante como factor de supervivencia lo encontramos en cáncer de pulmón, estómago estadios I-III, y cabeza y cuello estadios I-III.

Nuestros datos de proteómica fueron confirmados en una serie nuestra de casos de pacientes procedentes de dos hospitales, y que coinciden con los datos de TCGA (Imagen V.1). Los PTC expresan significativamente más PIAS2, y especialmente más PIAS2 isoforma beta, un resultado que no estaba descrito. Además, cuando se compara cada cáncer con su propio tejido normal PIAS2b infaliblemente en todos los casos tiene aproximadamente el doble de expresión en PTC. La isoforma PIAS2a tiene un comportamiento similar, aunque menos reproducible.







**Imagen V.1. La expresión de PIAS2 es un marcador de supervivencia en Carcinoma Diferenciado de Tiroides.** Se muestran los datos de RNAseq del consorcio TCGA (The Cancer Genome Atlas program, National Cancer Institute, USA) para carcinomas de tiroides de estadios I-II-III expresados como la FPKM media (número de Fragmentos Por Kilobase de exón por Millón de Reads (lecturas, Fragments Per Kilobase of exon per Million reads). Se ha eliminado el estadio IV por la posibilidad de que se incluyesen carcinomas anaplásicos que son clasificados directamente en ese estadio. La expresión del mRNA de PIAS2 es un factor significativo de mal pronóstico con peor supervivencia a 5 (98% frente a 80%), y 10 años (98% frente a 60%). Permitido por The Human Protein Atlas v16, [proteineatlas.org/human cell](http://proteineatlas.org/human%20cell) (Uhlen et al, 2017)

**Tabla V.1. Relación entre niveles de expresión de mRNA de PIAS2 y pronóstico de cáncer.**

(Calculada a partir de datos de Uhlen et al, 2017; HPA [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org). Cada tipo de cáncer se calculó incluyendo o excluyendo diversos estadios; se muestran cuando diferentes.

\*Glioma: supervivencia a 3 años)

Tipo de Cáncer	Cut-off (FPKM)	Significación /p valor	Pronóstico	Supervivencia 5 años High (%)	Supervivencia 5 años Low
<b>Tiroides</b>	<b>2,05</b>	<b>0,00013</b>	<b>Peor</b>	<b>77</b>	<b>97</b>
<b>Tiroides (sin E-IV)</b>	<b>2.05</b>	<b>0,00000072</b>	<b>Peor</b>	<b>80</b>	<b>98</b>
Hígado	0,85	0,0011	Peor	41	52
Hígado (sin IV)	0,85	0,0015	Peor	46	55
Endometrio	2,04	0,027		71	82
Colorrectal (sin IV)	0,62	0,0033	Peor	66	89
Colorrectal	0,62	No significativo		59	68
Melanoma	1,91	No significativo		0	38
Cérvix	1,87	No significativo		74	64
Próstata	2,4	No significativo		96	99
Testículo	1,61	No significativo		100	91
Riñón	1,22	No significativo		70	63
Urotelial	1,28	No significativo		34	44
Glioma	2,42	No significativo		0	13
Cabeza y Cuello	0,55	No significativo		47	41
Cabeza y Cuello (solo IV)	0,55	0,02	Mejor	43	34
Estómago	1,16	No significativo		38	31
Estómago (sin IV)	1,16	0,011	Mejor	44	27
Pulmón	1,06	0,037	Mejor	49	35
Mama	1,19	0,0096	Mejor	83	77
Ovario	1,87	0,0037	Mejor	38	25
<b>Páncreas</b>	<b>1,07</b>	<b>0,0018</b>	<b>Mejor</b>	<b>46</b>	<b>16</b>



No obtuvimos datos tan relevantes en inmunohistoquímica con rPIAS2, dónde apareció la tinción nuclear característica en casos benignos, de carcinoma diferenciado papilar y folicular o carcinoma diferenciado. Tampoco encontramos diferencias medibles de intensidad.

Como se ha comentado en la sección de Resultados, existe solamente un trabajo publicado en PTC que estudia la expresión de RNA de PIAS2, junto con otras enzimas relacionadas con el proceso de ubiquitinización y SUMOilación (Tuccilli et al, 2015). En algunos casos hay expresión alta, en otros baja, y no se llega a una conclusión clara. Sin embargo, este trabajo tiene varios defectos técnicos que podrían condicionar la falta de datos concluyentes.

Los PTC tienen característicamente activada la vía de ERK, bien sea porque pertenecen al grupo de BRAF-like donde tienen la mutación V600E BRAF o a través de reordenamientos de RET / NTRK activan BRAF; o bien porque pertenecen al grupo de RAS-like donde tienen mutado cualquiera de los genes RAS y activan ERK a través de c-RAF (Agrawal et al, 2014). Como se ha comentado anteriormente, la vía de ERK activa la transcripción dependiente del factor ELK1 gracias a una acción colaboradora de PIAS2a que tras la fosforilación de ERK induce la liberación de ELK1 del complejo con HDAC2, perdiendo así la SUMOilación inhibitoria de ELK1 y alcanzando su plena actividad (Yang et al, 2003). Podemos pensar entonces que el incremento de la expresión de PIAS2 en PTC es una consecuencia de la activación de ERK tan abundante de estos cánceres. Sin embargo, el papel sobre ERK lo tiene PIAS2a, y es independiente de su actividad SUMOilasa, y no lo puede ejercer PIAS2b. Y nosotros encontramos más aumentado PIAS2b que PIAS2a.

Una de las diferencias moleculares relevantes entre carcinomas diferenciados, PTC/FTC/OTC, frente a los PDTC y ATC es el estatus de p53. Cerca del 99% de los carcinomas diferenciados conserva p53 wt (Agrawal et al, 2014) frente a un 9% de los PDTC (Soares et al, 2011; Tavares et al, 2016; Landa et al, 2016; Lloyd et al, 2017). Varios trabajos demuestran que PIAS2, actuando como E3 SUMO ligasa, une y SUMOila en múltiples sitios a p53 reprimiendo su actividad

transcripcional (Schmidt and Müller, 2002; Wu et al, 2009; Chen et al, 2014). Los experimentos en un primer trabajo fueron realizados con proteínas purificadas, pero también en células HeLa transfectadas, demostrando que *in vivo* también se realiza esta acción (Schmidt and Müller, 2002). A destacar, una mutación puntual C236S en el RING finger de PIAS2b, que impide su actividad SUMOilasa pero no su unión a p53, invierte la acción represora y recupera la actividad transcripcional de p53 (Schmidt and Müller, 2002).

El mecanismo por el que p53 SUMOilada no es activo transcripcionalmente fue estudiado posteriormente (Wu et al, 2009). p53 se une a la p300CBP acetilasa como un tetrámero, y p53 acetilado se une a sus sitios en los promotores diana, como por ejemplo el promotor del gen CDKN1A/p21. La SUMOilación de p53 impide que p53 se acetile por p300, aunque no impide que se una al DNA. p53 SUMOilado es incapaz de activar sus sitios en el promotor para regular la transcripción.

Este dato ha sido reforzado por la demostración de la colocalización en células HeLa de p53 y PIAS2 mediante ensayo PLA (*proximity Ligation Assay*) (Chen et al, 2014). En este trabajo, donde se hacía un screening masivo de interacciones proteína-proteína en dichas células, se demostró también que PIAS2 se une directamente a PIAS1, a p15 y a AKT (Chen et al, 2014). No se une en cambio a SMAD4, a Myc, a p16 ni al receptor de andrógenos (AR) (Chen et al, 2014).

Este último resultado, aunque negativo, es importante porque, como se ha explicado en un anterior apartado de esta discusión, PIAS2 se describió inicialmente por su capacidad de asociación y modulación transcripcional de los receptores esteroideos (Moilanen et al, 1999; Kotaja et al, 2000; Kotaja et al 2002a; Kotaja et al 2002b) y claramente tiene una función en el testículo y la espermatogénesis, tanto en modelos de ratón como en datos derivados de metilación en pacientes infértiles (Yan et al, 2003; Santti et al, 2003; Zheng et al, 2004; Santti et al, 2005; Sarkar et al, 2019). Los DTC son más frecuentes en mujeres que en hombres (Ward et al, 2019) pero el sexo masculino se ha discutido como factor de peor pronóstico desde hace mucho tiempo debido a que los hombres tiene una presentación con cánceres de mayor

tamaño (Akslen et al, 1992). Se han publicado numerosos datos a favor y en contra de que el sexo varón fuese un factor de riesgo independiente o no del tamaño, pero los más recientes estudios indican que una vez diagnosticado no hay diferencias en el cáncer dependientes del sexo (Yorke et al, 2016). Todos estos datos moleculares y epidemiológicos descartarían un papel protumoral de PIAS2 mediado por acción en el AR.

Otra de las alteraciones características de carcinomas diferenciados pero que tienen un comportamiento agresivo es la vía de AKT. Cerca de un 4% de este tipo de carcinomas tienen mutaciones en PI3KCA, E542K, y la mutación directamente de AKT1, E17K, se va volviendo más frecuente conforme vaya aumentando el grado de dediferenciación (Landa et al, 2016; Pozdeyev et al, 2018) frente a un mantenido 0,5% en los DTC habituales de comportamiento no agresivo (Agrawal et al, 2014). Esto significa que la vía de PI3K/AKT es protumoral en carcinoma diferenciado de tiroides. En líneas celulares HeLa y de carcinoma de mama, la isoforma PIAS2a exclusivamente (frente a PIAS2b, PIAS1, PIAS3, PIAS4 que son negativas) SUMOila la proteína PTEN impidiendo o reduciendo su ubiquitinización y aumentando su estabilidad (Wang et al, 2014). Prosiguiendo este estudio en un modelo in vivo, los xenografts de células HeLa, sobreexpresando PIAS2a crecían significativamente menos que los controles, y esto no pasaba si los xenografts se originaban a partir de células HeLa-shPTEN con represión de la expresión de PTEN (Wang et al, 2014). Si estos resultados fuesen ciertos en carcinoma de tiroides PIAS2a estaría ejerciendo un papel negativo sobre la malignidad. De forma especulativa, si esto fuese cierto, podríamos pensar que PIAS2b tendría un papel distinto contra regulatorio, y sería la isoforma aumentada en cáncer diferenciado de tiroides coincidiendo con nuestros resultados.

En suma de todo lo que hemos discutido, y relacionándolo con nuestros resultados en los cultivos de DTC del tipo PTC tratados con PIAS2b dsRNAi sugerirían que el papel protumoral de PIAS2 en PTC sería en interfase y no tiene una función esencial en mitosis que no pueda ser sustituida por otra proteína, ya que las células de los cuatro cultivos T-PC (T-PC46, T-PC48, T-PC64, T-PC65) y de la metástasis

de PTC (T-M19) siguieron creciendo sin verse afectadas por la represión de la expresión de PIAS2b. Todos ellos tenían en común un status genético con BRAF V600E.

Sólo tuvimos la oportunidad de tratar un cultivo de FTC, T-FC7, y obtuvimos una inhibición del 50%. Este cáncer tenía mutación de NRAS Q61K pero por ahora se ha comportado como un carcinoma de bajo riesgo típico de DTC.

Entonces, podríamos pensar que el status BRAF mutado bloquee la acción de PIAS2b dsRNAi. Sin embargo, varias de las líneas anaplásicas que usamos tenían este estatus.

Por último, no podemos descartar que el efecto protumoral de PIAS2 en carcinoma diferenciado de tiroides no sea directamente en el epitelio, sino que sea mediado por inhibición de la acción o activación del sistema inmune como hemos discutido anteriormente como por ejemplo la inhibición sobre NF-kB, o sobre cualquiera de los mecanismos que activan al sistema inmune (Arora et al, 2003; Ungureanu et al, 2003; Rogers et al, 2003; Ungureanu et al, 2005).

#### ***V.4 PIAS2 en carcinoma anaplásico de tiroides: una función esencial en mitosis con posibilidades terapéuticas***

##### **V.4.1 PIAS2 dsRNAi 1 un antitumoral citotóxico en cultivos *in vitro***

Nuestros resultados son contundentes: en todas las líneas de cáncer anaplásico de tiroides y los tres cultivos primarios obtenidos de dos pacientes distintos PIAS2b dsRNAi 1 tiene un efecto anti-tumoral citotóxico y mediado por catástrofe mitótica. Por el contrario, PIAS2 dsRNAi 1 no ejerce ningún efecto antiproliferativo en el cultivo benigno obtenido en paralelo del mismo paciente anaplásico 1 (el cultivo benigno del paciente 2 no se pudo obtener). Tampoco ejerce efecto antiproliferativo en otros 7 cultivos primarios de tiroides normal, 6 cultivos primarios de enfermedad proliferativa benigna (bocio multinodular), ni como ya habíamos descrito en 4 cultivos primarios de carcinoma diferenciado papilar, 1 cultivo primario de metástasis linfática de carcinoma diferenciado papilar. A su vez, no hubo efectos

antiproliferativos en una línea de carcinoma diferenciado folicular de tiroides metastásica. Sí que hubo efecto anti-tumoral en una línea de carcinoma pobremente diferenciado de tiroides, pero con la secuencia PIAS2b dsRNAi 2. Tenemos un efecto dosis respuesta, ya que una concentración a la mitad prácticamente pierde el efecto en la línea anaplásica BHT-101, y lo reduce en 8305C y en CAL-62. Igualmente, en los cultivos primarios de anaplásico se reduce el efecto con la mitad de la dosis sobre todo en T-UC2 y T-UC3.

La pregunta es: ¿qué tienen en común todas las células anaplásicas de tiroides entre ellas que sea diferente en las células normales, benignas o de carcinoma diferenciado o pobremente diferenciado?

Primero pensamos en las mutaciones (ver Tablas IV.8 y IV.12). No tenemos toda la secuenciación de DNA genómico de nuestros dos pacientes, pero sí sabemos que ambos carcinomas tienen mutación del promotor de TERT, mutación de p53 y uno de los casos tiene mutación de RAS. Los dos casos son negativos para mutación de BRAF. En las líneas celulares, sí que se conocen la mayoría de estos datos. Dos de nuestras líneas tenían BRAF mutado (8305C y BHT-101), las CAL-62 tenían KRAS mutado y las MB-1 eran wt para ambos genes.

Todas las líneas tienen mutación de p53, pero también tenían p53 mutado las dos líneas de carcinoma pobremente diferenciado FTC-238 y BCPAP donde la acción de PIAS2 dsRNAi 1 es nula o distinta secuencia respectivamente. Todas las líneas tienen o bien mutado el promotor de TERT, o bien tienen mucha expresión de TERT mRNA (CAL-62, comunicación personal CAV). Pero esto también sucede en la línea FTC-238 donde PIAS2 dsRNAi 1 no tiene efecto.

Descartada la hipótesis genética, como segunda hipótesis es que hay dos características de los carcinomas anaplásicos que no poseen los carcinomas diferenciados o pobremente diferenciados: una es la desorganización celular con hechos microscópicos característicos (pleomórficas) llamada “anaplasia”, y la segunda las alteraciones genéticas conocidas como “aneuploidía” (contenido  $>2n$  en todas las células, con algunas presentando poliploidía ( $n*2n$ ) en células

“gigantes de anaplásico”. Ambas características podrían o no estar asociadas. Los carcinomas anaplásicos de otras localizaciones como próstata, hígado, páncreas, pulmón, tracto gastro-intestinal, útero y ovario presentan también ambas características asociadas, por lo que queda abierta la posibilidad de que PIAS2 dsRNAi funcione en más cánceres de este tipo (Kuhn et al, 2014; Dahm et al, 2015; Agaimy et al, 2016; Li et al, 2017; Alharbi et al, 2018).

Los carcinomas anaplásicos de tiroides expresaban significativamente menos mRNA de PIAS2b que los tejidos normales o benignos, y por supuesto mucho menos que los carcinomas papilares. PIAS2a no llegó a ser significativo. Y esto se mantenía cuando se compara los cultivos obtenidos de estos tejidos, donde ambas isoformas estaban claramente disminuidas. Una de las conclusiones a las que llegamos es que estos bajos niveles de PIAS2b son esenciales para el efecto anti-canceroso de PIAS2 dsRNAi. Sin embargo, nosotros observamos que la disminución de la proteína tras tratamiento con PIAS2 dsRNAi se producía en cultivos de distinto origen tanto normal como diferenciado como anaplásico, por lo que esto por sí solo no es el factor clave. Importante resultado fue el que la sobreexpresión de cualquiera de las dos isoformas de PIAS2 era también tóxica para las células anaplásicas, lo que sugiere que PIAS2 tiene una expresión muy medida en este tipo de células.

PIAS2 shRNA contra las dos isoformas de PIAS2 tiene un efecto antitumoral muy corto en el tiempo que en seguida se ve compensado. La diferencia de los shRNAs con los dsRNAi es la necesidad de la enzima Drosha. Los shRNA, al revés de los siRNA, se sintetizan en el núcleo de las células ya que se sintetizan a partir de vectores lentivirales que se integran en el genoma, se procesan y se transportan al citoplasma, y luego se incorporan al RISC para su actividad. En el núcleo se forman los pre-shRNAs por el complejo Drosha / DGCR8 (Zeng et al, 2005). Estos se transportan al citoplasma a través de la *exportin* 5, que los carga en el complejo DICER/TRBP/PACT y se produce el shRNA maduro. Este se asocia a la proteína *Argonaute* que contiene RISC y degrada el mRNA diana o suprime la traducción por la vía de los *P-bodies*. El dsRNAi introducido de forma exógena con 19 a 21 nucleótidos y dos nucleótidos *overhang*



en 3', puede ser cargada directamente en el complejo RISC para la función de dsRNAi sin interactuar con DICER (Rao et al, 2009; Wittrup and Lieberman, 2015; Lin and Gregory, 2015).

Hay resultados diversos sobre la expresión de Drosha y DICER en diversos tipos de cáncer, bien proponiendo que está reducida su expresión (Iorio et al, 2012; Poursadegh et al 2017) bien que está aumentada (Avery-Kiejda et al 2014). Por tanto, a este nivel no habría una explicación clara de por qué el shRNA tiene tan poco efecto.

Pero lo más interesante es el mecanismo por el que la proteína p53 mutada presenta una ganancia de función inhibiendo el procesamiento de ciertos pri-miRNAs a pre-miRNAs precisamente a través de la interacción negativa con Drosha y otras proteínas (Suzuki et al, 2009; Jiang et al, 2015; Garibaldi et al, 2016; Gurtner et al, 2016). Podría suceder que como todas las células anaplásicas tienen mutado p53, el efecto del antitumoral de shRNA se viera contrarrestado inmediatamente por una acción de las proteínas p53 mutadas.

En 2013 se publicó un estudio bioinformático *in silico* estudiando 12 mutaciones de p53 y los cambios en la expresión de genes que inducían, junto con los promotores de dichos genes (Garritano et al, 2013). El objetivo era aprender si las mutaciones de p53 generaban pérdida de función LoF por bloqueo de la expresión de genes o ganancia de función GoF por la inducción de nuevos genes. Entre los genes que se inducían por p53 mutado estaba PIAS2 con elementos consenso para p53 en el promotor de alta confianza (Garritano et al, 2013). Sin embargo, nuestros datos son contundentes tanto en tejido como en cultivo sobre la significativa reducción en la expresión de PIAS2b. Es probable que como el carcinoma anaplásico recolecta tantas mutaciones, el efecto de p53 mutado se vea modulado por el efecto de otras mutaciones.

No tuvimos ningún efecto de los as-LNA-GapMer (*Locked Nucleic Acids single-stranded antisense oligoribonucleotides*) en las dos secuencias testadas, bien la 3' UTR, bien la secuencia en medio del RNA. Estos siRNAs pueden entrar directamente en las células sin necesidad de lípidos y pueden ser usados *in vivo* (Stein et al, 2010). Los *antisense* LNA GapmeRs están presenten LNAs en las regiones



flanqueantes y DNA en un espacio central libre de LNA (Stein et al, 2010). La química del LNA tiene el oxígeno 2' y el carbono 4' del azúcar de la ribosa del RNA bloqueados en una estructura de anillo. Las regiones que contienen el LNA aumentan la afinidad de unión al RNA diana y confieren resistencia al oligo *antisense* contra las nucleasas. Cuando el GapmeR se hibrida con su RNA diana, el espacio central del DNA activa la degradación vía RNAasa H, sin necesidad de procesamiento previo por el complejo RISC. Los LNA GapmeRs son modificados con fosforotioato (PS), que aseguran la resistencia a la degradación enzimática (Stein et al, 2010).

Descartamos que estos oligos modificados no entrasen en la célula puesto que la fluorescencia del oligo marcado era intensa. La empresa que los diseña, tras prácticamente asegurar que su secuencia elegida funcionaba el 100% de las veces debido a su super-algoritmo, dice ahora que hay que probar más secuencias.

El no funcionamiento de este sistema frente al dsRNAi podría ser explicado por el tipo de mecanismo que tiene el as-LNA-GapmeR ya que no usa el complejo RISC para la degradación del mRNA diana y por el tipo de modificaciones que tiene. Nuestra conclusión es que las células anaplásicas tienen sistemas que detectan oligos modificados, o que de alguna forma en las células se impide el acceso a la maquinaria de actuación de este tipo de siRNAs. Estas diferencias podrían ser importantes para que el dsRNAi funcione en las células anaplásicas de tiroides y el as-LNA-GapmeR no funcione.

#### **V.4.2 PIAS2 dsRNAi 1 provoca catástrofe mitótica**

PIAS2 dsRNAi 1 mataba a las células. Tras excluir muerte por apoptosis y necroptosis, nuestros experimentos de time-lapse demostraron que PIAS2 dsRNAi provocaba parada al principio de la mitosis y que tras no poder seguir la célula moría mayormente en G2/M y profase, aunque alguna que se escapa lo hacía más tarde. Esto es catástrofe mitótica, aunque no existe un verdadero marcador que la indique.

La catástrofe mitótica esta descrita como siendo un mecanismo oncosupresor regulado que impide la proliferación y / o supervivencia de las células que no pueden completar la mitosis debido a un daño en extenso en el DNA, problemas con la maquinaria mitótica y / o falla de los puntos de control mitóticos (Galluzzi et al 2018). Es un proceso estrechamente controlado por varias proteínas reguladoras clave, como CDC2, ciclina B, aurora kinasa, p53 y miembros de las proteínas de la familia BCL-2, muchas de las cuales como p53 o BCL-2 están mutadas y acumuladas o no se expresan respectivamente en carcinoma anaplásico de tiroides (Saltman et al, 2006). En condiciones de stress, las células deficientes en miembros de la familia Bcl-2 no consiguen una muerte celular programada, pero pueden morir por catástrofe mitótica (Castedo et al, 2004; Shen et al, 2008). Muchos cánceres son resistentes a las terapias anticancerosas pues no consiguen inducir muerte celular limitando la efectividad del tratamiento anticanceroso (Niewerth et al, 2015). Mucha de la investigación se ha centrado en esta resistencia con el fin de mejorar el tratamiento de los pacientes con cáncer. Las células cancerosas son particularmente sensibles a la inducción de catástrofe mitótica debido a su tetraploidía / aneuploidía (Niewerth et al, 2015). La muerte celular a través de la inducción de catástrofe mitótica puede ayudar a superar la resistencia a los fármacos tumorales (Niewerth et al, 2015). La eliminación de células tumorales por agentes quimioterapéuticos que matan en otras fases requiere dosis altas, mientras que la dosis letal para la activación de catástrofe mitótica es significativamente más baja y con menos efectos secundarios (Huertas et al, 2012).

Por lo tanto, la inducción de catástrofe mitótica parece ser una buena estrategia para la eliminación de células tumorales y el desarrollo de nuevas estrategias contra el cáncer. Nuestros resultados sugieren que PIAS2b dsRNAi 1 podría ser una buena terapia para el carcinoma anaplásico de tiroides si lograra funcionar *in vivo*.

Si PIAS2b dsRNAi 1 mata a las células en mitosis es que PIAS2b es esencial para empezar o continuar la mitosis en células anaplásicas. Todos nuestros resultados parecían sugerir que PIAS2 era una proteína de Mitosis. De hecho, PIAS2 se acumulaba en mitosis tanto por *western blot* con los dos anticuerpos mPIAS2 / rPIAS2 como

por inmunofluorescencia, especialmente con el anticuerpo de mPIAS2, donde colocalizaba de forma muy intensa con Tubulina alfa, la proteína base del huso mitótico, desde el principio de la mitosis en Profase temprana hasta la Telofase, perdiéndose en la citokinesis.

#### **V.4.3 PIAS2 una proteína esencial para la mitosis de células anaplásicas**

La pregunta era qué proteínas de mitosis necesitaban PIAS2 para funcionar correctamente. La literatura que hemos revisado anteriormente, apartado V.1 de esta discusión, definía a PIAS2 hasta ahora como una enzima que actúa sobre todo en interfase.

Sólo hay un trabajo que relacione PIAS2 con mitosis. El grupo de Jakob Nilsson en Dinamarca, especializado en el estudio de Mitosis, diseñó una estrategia para identificar mediante técnicas proteómicas cuantitativas (SILAC) en células HeLa las proteínas SUMOiladas por SUMO2/3 durante el curso temporal de mitosis (Schou et al, 2014). Para ello, las células transfectadas con Flag-His-SUMO2/3 eran sincronizadas en mitosis con un bloqueo de Timidina, *release*, y posteriormente Taxol, para acabar con “*mitotic shake-off*” en ausencia o presencia de un inhibidor de Aurora Kinasa. De esta forma, al purificar las proteínas asociadas a His-SUMO seguido por purificación FLAG conseguían identificar 445 proteínas SUMOiladas distribuidas entre las SUMOiladas en la primera mitad de la mitosis y deSUMOiladas en la segunda mitad, y las SUMOiladas en la segunda mitad de mitosis, pero deSUMOiladas en la entrada en Mitosis. Entre las proteínas SUMOiladas en la primera mitad/deSUMOiladas en la segunda se identificó PIAS4, mientras que entre las proteínas más SUMOiladas a partir de la segunda mitad se identificó PIAS2, PIAS1 y PIAS3 (Schou et al, 2014). Se identificó UBA2 (SUMO E1 ligasa) y Ubc9 (SUMO E2 ligasa) que no variaban durante mitosis. Una de las proteínas que eligieron para la validación funcional de estos resultados fue RhoGDI que estaba muy significativamente SUMOilada al principio de mitosis y se deSUMOilaba en *Mitotic exit*. Haciendo interferencia con PIAS1, PIAS2, PIAS3 y PIAS4 siRNA, sólo PIAS2 y

PIAS3 siRNA bloqueaba la SUMOilación de RhoGDI sugiriendo un papel de estas dos enzimas en la primera mitad de la mitosis (Schou et al, 2014). Desafortunadamente, justo para esta diana RhoGDI no pudieron demostrar que un mutante en las K dianas de SUMO tuviera ningún efecto en mitosis (Schou et al, 2014).

Hay cinco trabajos que relacionan otras de las PIAS SUMO E3 ligasas con mitosis (Hari et al, 2001; Azuma et al, 2005; Ryu et al, 2010; Diaz-Martinez et al, 2006; Pelisch et al, 2014).

Hari et al demuestran que el homólogo de PIAS en *Drosophila melanogaster*, Su(var)2-10, donde sólo existe un gen PIAS, es esencial para la viabilidad embrionaria y requerido muy al principio cuando sólo se usan RNAs maternos, pero también más tarde en el cigoto cuando comienza la transcripción (Hari et al, 2001). Durante las mitosis, se encuentra un número muy elevado de mitosis anormales, con metafases no condensadas y anafases aberrantes (Hari et al, 2001). Su(var)2-10 no colocaliza con la cromatina mitótica. Además, también tiene otras funciones en interfase relacionadas con los telómeros, y la estructura nuclear.

Pelish et al utilizan como modelo las primeras divisiones mitóticas de oocitos de *Caenorhabditis elegans* tras la fertilización (Pelish et al, 2014). Demuestran que tras empezar la mitosis la SUMOilación de proteínas se va incrementando hasta la metafase e inicio de anafase, y que decae conforme progresa la anafase. El homólogo de PIAS PIAS(GEI-17), en *Caenorhabditis* solo existe un PIAS y un SUMO, co-localiza con SUMO y Ubc9 en el ecuador del huso en la metafase, justo en la *midzone*, y a partir de ahí en la anafase se reclutan ULPs como ULP4, SUMO proteasas equivalentes a SENP, que permiten continuar la anafase (Pelish et al, 2014). Finalmente demuestran que AIR-2/AURORA B es la proteína clave que se recluta tras la llegada de PIAS(GEI-17) y Ubc9, y es directamente SUMOilada (Pelish et al, 2014). Si se elimina Ubc9 aumenta la cantidad de AURORA B en la *midzone* pero no prosigue la anafase; si se elimina ULP4 desaparece AURORA B y la anafase empieza antes de tiempo (Pelish et al, 2014). Descartan cualquier alteración en localización o

tinción del ortólogo de la Topoisomerasa II, TOP-2, o de la Condensina I CAPG-1.

Azuma et al trabajan en oocitos de *Xenopus laevis* y demuestran que PIAS4 (Piasy, Pias gamma) recluta Ubc9 a la cromatina mitótica para SUMOilar Topoisomerasa II y que ésta ejerza su acción en la parte interior del centrómero (*inner centromer*) (Azuma et al, 2005). La Topoisomerasa II es esencial para la correcta segregación de los cromosomas en la anafase de mitosis, y la ausencia de PIAS4, pero no PIAS1, PIAS2a, PIAS2b o PIAS3, es esencial para la asociación de Topoisomerasa con Ubc9 (Azuma et al, 2005). En un siguiente trabajo igualmente en oocitos de *Xenopus* se demuestra que la región N-terminal de PIAS4, el dominio SAP, es la que se pega al centrómero en el agregado de proteínas conocido como kinetocoro que captura a los extremos de los microtúbulos (Ryu et al, 2010). Consiguen identificar dos proteínas, Rod y Zw10, que se unen directamente a PIAS4 en el kinetocoro (Ryu et al, 2010). KNTC1/ROD y ZW10 también en humanos forman parte del complejo mitótico RZZ en el kinetocoro responsable del correcto ensamblaje del huso y el kinetocoro y el reclutamiento de MAD1/MAD2 (Uniprot, 2019; <https://www.uniprot.org/uniprot>).

Díaz-Martínez et al confirman este mismo papel de PIAS4 en mitosis de células humanas HeLa (Díaz-Martínez et al, 2006). Las células tratadas con PIAS4 siRNA se acumulan en metafase de mitosis y no pueden separar sus cromátides hijas (anafase) porque la Topoisomerasa II no consigue concentrarse en el centrómero, aunque sí tiñe sin diferencias con los controles los cromosomas condensados o *core* (Díaz-Martínez et al, 2006). Otras proteínas centroméricas como INCENP o CENP-F no alteran su localización cuando se comparan con transfectadas *off-target*. Al no poder separarse en la Metafase, se dispara el *checkpoint* que depende de Aurora kinasa B, de forma que un inhibidor de Aurora Kinasa ZM447439 permite continuar la mitosis (Díaz-Martínez et al, 2006).

Por otra parte, en un estudio proteómico global de proteínas SUMOiladas específicamente asociadas a cromosomas mitóticos

excluyendo el huso mitótico, se identifican unas 228 proteínas tanto asociadas a la matriz o *scaffold* como al centrómero, entre las que hay incluso alguna E3 ligasa como RanBP2, pero ningún PIAS entre las identificadas (Cubañas-Potts et al, 2015). Esto descartaría la implicación de PIAS2 con la cromatina mitótica. Aunque hay observaciones de que esa E3 SUMOilasa RanBP2, específica de vertebrados, tiene un importante papel mitótico en la promoción de las uniones correctas de los microtúbulos a los kinetocoros (Salina et al, 2003; Joseph et al, 2004; Arnaoutov et al, 2005; Rundle et al, 2006). Datos recientes en líneas celulares humanas como U2OS y HEK293 confirman que RanBP2 se une a NUSAP1 entre los extremos de los microtúbulos kinetocóricos y el centrómero (Mills et al, 2017).

Un último aspecto de este repaso de SUMOilación en mitosis viene dado por las SUMOilasas, o isopeptidasas de SUMO, la familia SENP en vertebrados. Las tres más directamente asociadas con mitosis son SENP1, SENP2 y SENP6 (Cubañas-Potts et al, 2013). En células HeLa, SENP2 se asocia con Nup107-160-Karyopherin a en el kinetocoro de profase, y su sobreexpresión causa parada en prometafase de mitosis, *mitotic arrest* (Cubañas-Potts et al, 2013). SENP1 también se asocia más ampliamente con el huso, además del kinetocoro, y su sobre-expresión no causa fenotipo. Sin embargo, la reducción de SENP1 con siRNA provoca un arresto mitótico en anafase (Cubañas-Potts et al, 2013). Estos datos coincidirían con el papel de la SUMOproteasa ULP4 para la progresión de anafase demostrado anteriormente en *Caenorhabditis elegans* (Pelish et al, 2014).

Tras esta revisión bibliográfica, y para intentar entender que proteínas podrían estar relacionadas con PIAS2 en mitosis, se investigó las proteínas asociadas a PIAS2 en inmunoprecipitados. Se identificaron 1.985 proteínas de las cuales una de ellas era PIAS2. También, como se esperaba, una proporción destacada de proteínas se identificaba con Mitosis en el Reactome v68 (Fabregat et al, 2018; <https://reactome.org/>) (170 proteínas), pero específicamente también con el Centrosoma (99 proteínas). Por último, 58 proteínas se asociaban

a SUMO en la GOpachway, algunas de ellas ya demostradas previamente que se asociaban a PIAS2 (por ejemplo, PARK7 o TP53).

Al cruzar nuestra lista con los datos del trabajo del grupo de Nilsson de las proteínas SUMOiladas en mitosis de células HeLa explicado más arriba (Schou et al, 2014), encontramos que de nuestras 1895 proteínas que se unen a PIAS2 en extractos de células mitóticas anaplásicas, 117 coinciden. (Tabla V.2).

**Tabla V.2. Cruce de datos entre nuestros resultados de proteómica y el trabajo de que investiga proteínas SUMOiladas en mitosis en células HeLa (Schou et al, 2014).** El Ratio Mitotic Arrest/Mitotic Exit indica si la proteína está SUMOilada en la primera mitad de la mitosis o en la segunda mitad: 0-1: SUMOiladas en la segunda mitad (naranjas); >1: SUMOiladas en la primera mitad (azules). En negrita proteínas importantes en esta discusión.

Protein Name A-IG	Ratio Mitotic arrest/ Mitotic exit	Protein Name IK-RP	Ratio Mitotic arrest/ Mitotic exit	Protein Name RP-Z	Ratio Mitotic arrest/ Mitotic exit
ANXA1	1,53	IK	0,89	RPL27	1,14
ARID4B	0,96	ILF2	0,87	RPL38	1,16
BCLAF1	1,04	ILF3	0,86	RPL7	1,04
CCT8	1,05	INTS3	0,49	RPLP2	0,69
CD3EAP	0,81	JUN	0,39	RPS16	1,29
CDC73	1,18	KIF4A	1,04	RPS3	1,01
<b>CDK1</b>	1,02	KRR1	1,32	RPS8	1,01
CHD4	0,54	KRT18	1,06	RPS9	1,11
CSDE1	1,30	LMNB1	0,61	RPSA;RPSAP58	1,08
CTNND1	0,84	MATR3	1,10	RSL1D1	1,14
DDX21	0,85	MCM3	0,96	RUVBL1	0,76
DDX3X;DDX3Y	1,19	MCM7	1,11	SAFB	0,83
DDX5	0,94	MKI67	0,64	SAP30	0,58
DKC1	0,88	NCAPG	0,78	SART1	0,74
EIF4A1;EIF4A2	1,28	NCL	0,83	SERBP1	1,10
ETF1	1,43	NFATC2IP	1,54	SMARCA5	0,50
EXOSC10	0,43	NOP2	0,86	SMARCE1	0,51
FEN1	1,21	NOP58	0,76	SMCHD1	0,55
FMR1	1,24	NPM1	0,99	SNRPD3	1,04
FUBP3	1,06	NUMA1	0,53	SPATA5	3,30
FXR2	1,20	PABPC1;PABPC3	1,14	SSRP1	1,26
G3BP1	0,90	PHGDH	1,24	STAM	1,16
GATAD2B	0,38	<b>PIAS2</b>	0,71	STIP1	1,18
GLI2	0,60	PML	1,05	STMN1;STMN2	0,86
GTF2I	0,37	<b>PPIA</b>	1,46	SYMPK	0,79
GTF3C4	0,74	PSMD11	1,11	TARDBP	1,10
HCFC1	0,66	PSMD3	1,17	TCERG1	0,78
HDAC1	0,48	PUF60	1,09	<b>TPX2</b> ;HCA90	1,12
HDAC2	0,68	RALY	1,07	TRA2B	1,07
HNRNPA0	1,11	RAN	1,61	TRIM28	0,36



HNRNPA3	1,22	RANGAP1	0,89	TRIP13	1,27
HNRNPH1	1,09	RBM14	1,01	TRRAP	0,63
HNRNPH3	1,08	RBM25	0,90	<b>TUBB;</b> <b>TUBB2B;</b> <b>TUBB2A;</b> <b>TUBB4;</b> <b>TUBB3</b>	1,18
HNRNPM	1,13	RBMX; RBMXL1; RBMXL2	1,29	U2SURP	0,86
HNRNPR	1,07	RFC1	1,07	USP39	0,68
HNRNPUL1	0,81	RPL11	1,41	XRCC6	1,22
HNRNPUL2	0,67	RPL13	1,05	ZC3H11A	1,18
IFI16	1,08	RPL14	0,95		
IGF2BP1	1,09	RPL21	1,37		
IGF2BP3	1,19	RPL26; RPL26L1	1,22		

Algunas de las proteínas que coinciden entre las dos listas, y que por tanto estarían directa o indirectamente asociadas a PIAS2 en células anaplásicas de tiroides y además, estarían reguladas por SUMOilación durante mitosis con validación funcional (Schou et al, 2014), serían buenos candidatos para los resultados observados con PIAS2 dsRNAi, como se verá a lo largo del resto de la Discusión.

Los centrosomas reclutan múltiples factores reguladores y de nucleación de microtúbulos, como la tubulina gamma (Teixidó-Travesa et al, 2012). Entre las proteínas identificadas hay varios sustratos comunes tanto para PLK1 como para AURKA, incluida la Pericentrina, la subunidad de tubulina gama GCP2 y la proteína centrosomal Cep215 (Santamaria et al, 2011). TUBG1 y la subunidad de tubulina gama GCP2 (TUBGCP2) son otras de las proteínas que salen identificadas asociadas a PIAS2. Estas proteínas están descritas juntamente con CDK5RAP2 (en *Drosophila* Cnn), 76P (en *Drosophila* Grip75) y TUBGCP3 (en *Drosophila* l(1)dd4) como importantes para mantener la estructura del centrosoma en las líneas celulares humanas SL2 y HaCaT y cuando se alteran de estas proteínas, los centrosomas se ven alterados en número o morfología (Müller et al 2010).

La validación funcional de estos datos se demostró con la co-inmunoprecipitación y western de Aurora Kinasa A (AURKA), Tubulina gamma (gTubulin), Tubulina alfa (aTubulin) y PP2A. AURKA y aTubulin se unían a PIAS2b endógeno, pero también a las

proteínas sobreexpresadas Flag-hPIAS2b y EGFP-hPIAS2b. gTubulina y PP2A sólo se unían a la proteína endógena, reforzando la idea que las células transfectadas probablemente tenían un defecto en progresión a mitosis.

Se realizó otra validación funcional por colocalización en microscopía confocal. AURKA y PIAS2 empiezan a colocalizar en algún momento de la Profase, pero no al principio, *late Prophase*. A partir de ahí se incrementa la asociación y los dos contingentes de ambas proteínas están completamente asociados. A partir de la Anafase, AURKA empieza a desaparecer como es esperable, quedando PIAS2. A partir del final de la Telofase/*Early* Citokinesis PIAS2 ya se localiza en los núcleos de forma difusa. Esta misma colocalización PIAS2-AURKA se repitió en todas las líneas celulares de anaplásico, 8305C, CAL-62, BHT-101 y MB-1, y en los tres cultivos anaplásicos de paciente T-UC1-2-3, pero también se observó en el cultivo de tiroides normal T-NT2. Por tanto, no es la localización de PIAS2 en mitosis *per se* la diferencia que explique el efecto de PIAS2 dsRNAi 1.

En las células anaplásicas tratadas con PIAS2 dsRNAi 1 se acumulaba AURKA fosforilada globalmente, y especialmente en Thr-288 un sitio que demuestra su máxima activación (Walter et al, 2000; Hirota et al, 2003; Bayliss et al, 2003; Zhao et al, 2008). Por otra parte, CDK1 estaba absolutamente desfosforilado en Tyr-15, un sitio inhibitorio (Strausfeld et al, 1994), lo que demuestra también su máxima activación. La fosfatasa PP2A se encontraba alterada de forma importante en su peso, y además fosforilada en un residuo inhibitorio, la Tyr-307 (Horn et al, 2007; Uniprot, 2019 información deducida).

Curiosamente, mientras AURKA y CDK1 estaban plenamente activas, la Histona H3 no se fosforilaba lo que claramente indicaba parada en el inicio de la mitosis debido a PIAS2 dsRNAi 1. Esta reducción de p-H3 se pudo cuantificar también en microscopía confocal, dando una diferencia significativa.

Al teñir para gTubulin apareció una tinción inesperada. Los núcleos de las células tratadas con PIAS2b dsRNAi 1 tenían una distribución en spots muy específica y repetida. Mientras que las células normales no presentaban más de 5 spots por núcleo, las tratadas

presentaban unos 23 spots por núcleo. Como la gTubulin se asocia principalmente a los centrosomas en interfase y en mitosis, teñimos para Pericentrina, una proteína específica de centrosoma, y observamos que había alteraciones muy marcadas del número y, sobre todo, la morfología de los centrosomas descritas previamente en células de *Drosophila* y humanas en mitosis en análisis de *high-throughput* para interferencia por siRNA de proteínas del centrosoma (Müller et al 2010).

Esto significaba que el centrosoma estaba alterado, pero también que la gTubulin no centrosómica, que parecía asociarse con centrómeros/kinetocoros no estaba funcionando correctamente. Como la tinción *spotty* de Tubulina gamma parecía sugerir localización cercana a kinetocoros se cotiñó para CREST, BUB3 y Tubulina gamma. Estos spots de Tubulina gamma también co-localizan con BUB3, se podía observar patrones alterados como núcleos negativos para BUB3, núcleos condensados, células con dos núcleos o husos mitóticos anormales, BUB3 en *spots* sin CREST. Lo mismo sucedía con la tinción para Tubulina gamma y CREST, la co-localización era fuerte en los spots de ambas proteínas, y ocasionalmente en alguna célula en mitosis con los centrosomas alterados aparecía CREST cercano a la membrana. En las células control ns-dsRNAi, BUB3 y CREST no co-localizaban exactamente, pero eran colindantes ya que una tiñe el *inner* kinetocoro y la otra el *outer* kinetocoro, y en la tinción CREST y tubulina gamma tampoco había co-localización.

Como PIAS2 es una SUMOilasa hemos realizado un estudio bioinformático profundo de las 199 proteínas en busca de sitios consenso *bona fide* de SUMOilación. Los sitios consenso pueden ser sitios covalentes de SUMOilación o sitios no covalentes llamados SIMs (*SUMO-interaction motifs*). Estudios en las dianas de SUMO demuestran que la lisina K de los sitios covalentes se encuentra en una región *consensus*  $\Psi KxE$  (con un residuo hidrofóbico:  $\Psi$  y cualquier aminoácido: x), que se une al sitio de unión de la enzima conjugadora E2 (Ubc9). Se utilizó el programa JASSA v4 (*Joined Advanced Sumoylation Site and Sim Analyser*, <http://www.jassa.fr>) y el GPS-SUMO 1.0 (*Prediction of SUMOylation Sites and SUMO-interaction*

*motifs*, <http://sumosp.biocuckoo.org/> ) (Zhao et al, 2014; Beauclair et al, 2015) para predecir cuales de las proteínas identificadas por espectrometría de masas podrían estar SUMOiladas y ser un posible sustrato para PIAS2 (Apéndice 3). En el programa JASSA, la predicción se basa en un sistema de score que se basa en la Matriz de frecuencia de posición (PFM) derivada de la alineación de secuencias validadas experimentalmente. Permite determinar regiones *consensus* directas e invertidas y SIMs (Beauclair et al, 2015). El programa GPS-SUMO predice los sitios covalentes de SUMOilación y los motivos de interacción SUMO (SIMs), no covalentes en proteínas. Este programa se basa en un algoritmo GPS, sistema de predicción basado en un grupo optimizado por nube de partículas (Zhao et al, 2014). En los programas, existen variantes a la región *consensus* que incluyen regiones de SUMOilación dependientes de aminoácidos cargados negativamente (NDSM), regiones de SUMOilación dependientes de fosforilación (PSDM) y regiones de fosforilación y SUMOilación conjunta. También están descritas regiones *consensus* invertidas ([E/D]xKΨ) (Beauclair et al, 2015). Estos programas se pueden configurar para usar diferentes *thresholds* de predicción. Para predecir los sitios de SUMOilación y SIMs en el programa JASSA se utilizaron los máximos *thresholds* permitidos por el programa. Para los sitios de SUMOilación, el High y para los SIMs, el Very High. En el programa GPS-SUMO también se usó el máximo *threshold* permitido por el programa, el High.

Como se muestra en el Apéndice 3, sólo 24 proteínas no presentan sitios consenso de alta fiabilidad para SUMOilación covalente, o de interacción con SUMO. En la Tabla V.3 una selección de las proteínas con sitios consenso de SUMOilación o interacción con SUMO que creemos pueden tener importancia en el mecanismo de PIAS2b dsRNAi1 puesto que su función se localiza al principio de la mitosis. AURKA, gTubulin, aTubulin y PPP2A ya han sido validadas por co-inmunoprecipitación por su asociación con PIAS2.

PLK1 activa CDC25C (Toyoshima-Morimoto et al, 2002) e inactiva WEE1 y MYT1 permitiendo la desfosforilación de CDK1 y su activación mediante asociación con la ciclina B1. PLK1 fosforila la ciclina B (Toyoshima-Morimoto et al, 2001) y desencadena la degradación de WEE1 (Zitouni et al, 2014) y Bora (Chan et al, 2008).

La fosforilación de Bora por PLK1 inicia una ruta que conduce a la redistribución de AURKA desde un complejo que contiene Bora citoplasmático a un complejo que contiene TPX2 que es importante para la maduración del centrosoma y la formación del huso bipolar (Gruss et al, 2001; Chan et al, 2008). PLK1 promueve el reclutamiento de AURKA a los centrosomas a finales de G2 (Hanisch et al, 2006). Aunque para PLK1 en nuestro análisis nos haya salido un sitio *consensus* invertido en K191, hay un trabajo en que demuestran la importancia de que PLK1 sea SUMOilado en la lisina K492. La Ubc9 es reclutada a PLK1 tras su fosforilación y activación por CDK1/ciclinaB. En experimentos *in vitro* e *in vivo* PLK1 es SUMOilada por SUMO-1. Esa SUMOilación produce la entrada de PLK1 en el núcleo y aumenta su estabilidad que es esencial para la progresión normal de la mitosis y la integridad del genoma (Wen et al, 2017).

AURKA es una kinasa fundamental que tiene varias funciones en la mitosis. Está localizada en los centrosomas y los polos del huso y es principalmente responsable por la maduración y separación del centrosoma para el ensamblaje del huso bipolar durante la mitosis (Gautschi et al, 2008; Lens et al, 2010). AURKA también regula el punto de control de huso mitótico, la entrada en la mitosis, la función del kinetocoro, la citocinesis, la división celular asimétrica y determina el destino celular (Green et al, 2011; Yim et al, 2013). La inhibición o sobreexpresión de AURKA dan origen a inestabilidad genómica, aneuploidía y formación de tumores (Steehmaier et al, 2007; Galluzzi et al, 2018). La actividad de AURKA aumenta desde la fase G2 tardía en adelante y alcanza su punto máximo durante la fase final de la prometáfase. La activación de AURKA requiere la unión a cofactores específicos que incluyen Ajuba, Bora y TPX2, lo que lleva a la autofosforilación del importante residuo Thr288 en el *T-loop* (Karthigeyan et al, 2011). Parece que AURKA se fosforilaría en el sitio Thr288 y se activaría y activa PLK1 a través de la fosforilación de su *T-loop* (Thr210) por AURKA con su cofactor, la proteína aurora boreal (Bora) (Seki et al, 2008).

De forma especulativa podríamos proponer que mientras las células tratadas con ns-dsRNA AURKA es SUMOilada y siguen una mitosis normal, en las células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1 AURKA no sería SUMOilada. Y de alguna forma esto impediría su desactivación imprescindible para la correcta progresión de la mitosis.

AURKA tiene un sitio diana de SUMO altamente conservado en la lisina con posición 258. Hay un trabajo de Pérez de Castro et al, 2011, donde estudian la SUMOilación del sitio altamente conservado de AURKA K249 de ratón. Demuestran que cuando AURKA no se puede SUMOilar hay un aumento significativo de las anomalías mitóticas. Estas aberraciones se manifiestan en husos monopolares, husos multipolares y fallo de la citokinesis. Pero, y esto tiene relación directa con nuestros resultados, también afecta la nucleación de los microtúbulos y formación del huso durante la mitosis.

Hay otro trabajo, del grupo de Lombes en Francia, donde relacionan la región *consensus* de SUMOilación del receptor mineralocorticoide (MR) que es similar al de AURKA, con PIAS2b. PIAS2b tenía la capacidad de inhibir la actividad transcripcional de hMR (Tallec et al, 2003).

Otra de las proteínas de nuestra lista es TPX2 que tiene 3 sitios de SUMOilación *consensus* invertida y un sitio *consensus* dependiente de fosforilación (Hendriks et al, 2017). TPX2 es el factor que nuclea los microtúbulos del huso y que acerca AURKA al microtúbulo (Walter et al, 2000; Hirota et al, 2003; Bayliss et al, 2003; Zhao et al, 2008). Alteraciones de la SUMOilación de AURKA y TPX2 podrían explicar porque no progresan en mitosis las células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1, sus alteraciones en los centrosomas y la dinámica alterada de los kinetocoros llevando a la muerte por catástrofe mitótica.

La fosfatasa PP2A es la responsable de fosforilar AURKA en Ser-41, para inactivarla e inducir su degradación, y que pueda proseguir la mitosis a partir de la metafase (Horn et al, 2007). Los niveles de pTyr307-PP2AA están aparentemente aumentados en presencia de PIAS2 dsRNAi pero además a un peso muy superior, lo que sugiere alguna modificación tipo ubiquitinización que le impide defosforilar AURKA (LeNoue-Newton et al, 2011). Como se puede observar en la

Tabla V 3 PP2A tiene un sitio SUMO, bien esto bien la ubicuitinización (LeNoue-Newton et al, 2011), explicaría la banda superior de alrededor de 130kDa de pTyr307-PP2AA que aparece consistentemente aumentada en PIAS2 dsRNAi.

**Tabla V.3. Predicción de sitios covalentes de SUMOilación y no covalentes SIMs (SUMO-interaction motifs) de las Proteínas identificadas en proteómica global relacionadas con la mitosis usando los programas de predicción JASSA v4 y GPS-SUMO 1.0.** USP: Unused ProtScore; Global FDR 1%; 92.6% confidence. BPS: Best Predicted Score and Predicted Score (Predictive Score MAX: 38,183 y Cutoff: 12,812)

Proteínas identificadas relacionadas con Mitosis CYTO_Reactome (n=170)		USP	JASSA v4 (Joined Advanced Sumoylation Site and Sim Analyser): Putatif SUMO sites and Putatif SIMs				GPS-SUMO 1.0 (Prediction of SUMOylation Sites and SUMO-interaction motifs)			
Protein Entry	Protein Name		Position K	Sequence	BPS	Type	Position	Peptide	Threshold	Type
O14965	AURKA	5.33	K258	HSKRVIHRDIKPE NLLGSAG	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	258	RVIHRDIKPE NLLLG	High	Sumoylation
			K271	NLLGSAGELKIA DFGWSVHA	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
			K309	EMIEGRMHDEKV DLWSLVLC	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
O43684	BUB3	17.87	K322	FIRQVTDKETPK SPCT	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
Q7Z4H7	HAUS6	4.26	K231	PYDDHSNMEEKI QKVRSLWAS	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	319	NEVLKVMKYE RCQAD	High	Sumoylation
			K561	SPQLSEGKEIKLE ELIDSLGS	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	562	LSEGKEIKLEE LIDS	High	Sumoylation
			K657	DFGQSHLTEEKVI SDCECPVQ	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	935	LGELPNLKEE DILNK	High	Sumoylation
P53350	PLK1	5.02	K191	NLFLNEDELVKIG DFGLATKV	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				



P67775	<b>PPP2CA</b>	23.06	<b>K4</b>	----- MDEKVFVKELDQ WI	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus inv				
Q9ULW0	<b>TPX2</b>	5.89	<b>K47</b>	LEDVVGVPKKVL PITVPKSP	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus inv				
			<b>K55</b>	DKERQLQKEKKI KELQKGEVP	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus inv				
			<b>K58</b>	HFDITINLPEKKVK NVTQIEPF	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus inv				
			<b>K64</b>	TVISQEPFVPKKE KKSVAEGL	High	Putatif SUMO sites  High consensus PDSM				
Q9BQE3	<b>TUBA1C</b>	8	<b>K91</b>	ACFEPANQMVKC DPRHGKYMA	High	Putatif SUMO sites  SUMO-Ac switch				
			AA 114- 117	GHYITIGKEIDL VLDLRIRKL	14.851	SIM Type β				
P68366	<b>TUBA4A</b>	10	<b>K91</b>	ACFEPANQMVKC DPRHGKYMA	High	Putatif SUMO sites  SUMO-Ac switch				
P23258	<b>TUBG1</b>	23.62	<b>K91</b>	ACFEPANQMVKC DPRHGKYMA	High	Putatif SUMO sites  SUMO-Ac switch				
			AA 114- 117	GHYITIGKEIDL VLDLRIRKL	14.851	SIM Type β				

#### Consensus

**PDSM:** phosphorylation-dependent SUMOylation motif; **NSDM:** negatively charged amino acid-dependent SUMOylation motif; **HCSM:** hydrophobic cluster SUMOylation motif; **SC-SUMO:** synergy control motif; **SUMO ac-Switch:** SUMO acetyl Switch

#### Consensus inverted

**SIMs and motifs type:**

SIM Type α: [V/I]-[x]-[V/I]-[V/I]; SIM Type β, [V/I]-[V/I]-[x]-[V/I/L]; SIM Type a, [P/I/L/V/M]-[I/L/V/M]-[x]-[I/L/V/M]-[α/S]3;  
SIM Type b; [P/I/L/V/M/F/Y]-[I/L/V/M]-[D]-[L]-[T]

Nuestros resultados parecen indicar que en las células anaplásicas de tiroides tratadas con ns-dsRNAi las células entran en mitosis y su progresión es normal mientras que en las células tratadas con PIAS2 dsRNAi 1 algo las impide progresar en mitosis. Estos datos coinciden con nuestros resultados anteriores donde la muerte por catástrofe mitótica es al inicio de la mitosis.

Como el número de *spotys* de tubulina gama en las células tratadas con PIAS2b dsRNA 1 eran alrededor de 21-23 que es número de kinetocoros pensamos que tubulina gamma estaba unida a los kinetocoros. Esa unión solamente esta descrita en un trabajo en meiosis de oocitos de *Drosophila* durante la Profase I, que presenta una imagen similar a la nuestra en los núcleos ya que las células están paradas por tiempo en esta fase de meiosis (Hughes et al, 2011). La Tubulina gamma 1 es esencial para la nucleación de los dos extremos de los dos microtúbulos en el kinetocoro durante la prometafase de la meiosis I (Hughes et al, 2011).

HAUS6 es una proteína significativamente asociada con PIAS2 en nuestro estudio de proteómica global y también tienen sitios *consensus* para SUMO. El sitio *consenso* de HAUS6 es similar a la proteína TOP2, una proteína de levaduras que se SUMOila/deSUMOila por el sistema Smt3/SUMO-1// Smt4 y Ulp1 (Bachant et al, 2002).

Por otra parte, también esta descrito que en ausencia de AURKA, MAD2, una proteína que normalmente desaparece una vez que se realiza la conexión adecuada entre kinetocoro y microtúbulos, permanece presente incluso en la metafase (Janeček et al, 2016). Un número elevado de kinetocoros marcados por la tinción de la proteína MAD2 significa que hay un retraso o parada en la mitosis al no poder alinear correctamente la unión de los microtúbulos a ambos lados de los dos kinetocoros de cada cromosoma en el centrómero (Carvalho et al, 2015). Esto puede ocurrir cuando la expresión de la proteína Aladin (AAAS) esta reprimida, una proteína que se encarga de que AURKA, HURP y HAUS6 se localicen correctamente en el huso mitótico para proseguir la mitosis (Carvalho et al, 2015). Aladin es una de las proteínas que nos sale asociada a PIAS2, pero no tiene sitios consenso de SUMOilación.

AAAS, AURKA, HAUS6, BUB3 y NDC80 son proteínas significativamente asociadas con PIAS2 en nuestro estudio de proteómica. Al no haber una correcta formación del huso mitótico y la incorrecta unión del kinetocoro al microtúbulo se activaría el punto de control SAC inhibiendo el APC/C a través del complejo inhibitorio del *checkpoint* mitótico MCC (Herzog et al, 2009; Sacristan et al, 2015). El

ensamblaje de MCC está orquestado por la kinasa MPS1, que se asocia con el sub-complejo NDC80-C de la red KMN (Sacristan et al, 2015). Ahí, organiza el reclutamiento de una red interconectada de proteínas SAC que incluye los componentes: BUB1, BUB3, MAD1, MAD2 y BUBR1. (Murray et al, 2011, Vleugel et al, 2012).

Con estos resultados se puede decir que PIAS2 dsRNAi 1 bloquea la mitosis desde su comienzo generando alteraciones centrosómicas y parada en la dinámica de los kinetocoros, pero la forma como actúa PIAS2 y cuál es su sustrato en este proceso todavía aun no es claro.

Como se dijo anteriormente PIAS 2 es una E3 SUMO ligasa y poco se sabe sobre SUMOilación que relacione PIAS2, sus sustratos con mitosis en todos los sistemas, desde levaduras, gusanos, mosca *Drosophila melanogaster* y vertebrados. Aunque PIAS2 está descrita en varios trabajos como una E3 SUMO ligasa, falto por probarlo en este trabajo. Para probar que los sustratos de PIAS2 habría que inmunoprecipitar SUMO y hacer *western blot* contra algunas de nuestras proteínas candidatas (PLK1, AURKA, TPX2, PPP2CA, HAUS6; BUB3; TUBG1) y luego hacer co-localización por inmunofluorescencia.

#### **V.4.4 PIAS2 dsRNAi1 un antitumoral citotóxico en oPDX in vivo**

El siguiente paso de este trabajo fue saber si nuestros resultados *in vitro* se reproducían *in vivo*. Para ello hicimos una *proof of concept* en ratones.

Como queríamos que nuestro modelo animal fuese lo más real posible, semejante a carcinomas anaplásicos de tiroides de pacientes, generamos un xenoimplante ortotópico con células de paciente “orthotopic patient-derived xenografts” (oPDX) del cultivo T-UC1 en ratones inmunodeprimidos, NOD SCID. Este sistema sería mucho más difícil que los demás puesto que exigía tratamiento sistémico, pero era el que mejor representaba la realidad.

Como queríamos seguir los tumores a lo largo del tiempo midiendo bioluminiscencia en el aparato IVIS (*Spectrum in vivo imaging system*) desde su implementación, formación-crecimiento y después para ver los efectos de los tratamientos infectamos las células con un retrovirus que expresaba luciferasa.

La población de células implantadas se dejó crecer durante 5 semanas y en ese momento los animales presentaban grandes masas en el cuello. En cierto modo, esto iba en nuestra contra puesto que en los pacientes estos tumores se empezarían a tratar antes con cirugía sin dejar que llegasen a estos volúmenes.

Transcurridas estas semanas se empezarán a tratar 5 ratones con una mezcla ns-dsRNAi y 4 ratones con PIAS2b dsRNAi. Los dsRNAi *in vivo* son inestables por lo que hubo que buscar un vehículo. Elegimos Atelocolageno (AteloGene Koken, Cosmobio) porque era el que tenía trabajos en modelos ortotópicos de ratón, con tratamientos por vía sistémica que habían funcionado (Takei et al, 2004; Takeshita et al, 2005; Takahashi et al, 2013). Se trataron los animales dos veces a la semana durante tres semanas por vía sistémica. Al final del tratamiento se esperó una semana más y después se terminó el experimento para su análisis.

Los ratones con la mezcla PIAS2b dsRNAi 1 y *Atelocollagen* redujeron a la mitad el crecimiento del oPDX durante las siguientes cuatro semanas del tratamiento. La curva de ajuste Lowess muestra un comportamiento diferente del grupo control (crecimiento progresivo) frente al tratado (estabilización). Esto también coincide con nuestra clasificación individual de cada individuo tratado por criterios RECIST.

El modelo *in vivo* también fue validado, los tumores generados mantienen los marcadores característicos del tejido anaplásico humano como PAX8, Citokeratinas 8/18, p53 (mutado) y Ki67, siendo negativo para los marcadores fenotípicos tiroideos como Tg y TTF1 como pasa en el tejido de los pacientes.

Como no hay un marcador de patología específico de catástrofe mitótica se han contado cuerpos condensados con eosina muy marcada y hematoxilina fragmentada. Los tumores tratados con PIAS2b dsRNAi

1 presentaron significativamente mayor detección de este tipo de células, que asociamos con catástrofe mitótica.

Los resultados *in vitro* e *in vivo* confirman PIAS2b dsRNAi 1 como un posible tratamiento para el carcinoma anaplásico de tiroides. A lo mejor, podría incluso probarse en carcinomas muy desdiferenciados de otros tejidos.

Siguiendo con nuestra idea de que pudiera aplicarse a la clínica algún día, decidimos explorar la variabilidad de las secuencias PIAS2 dsRNAi en el genoma humano, buscando SNPs que impidiesen la efectiva acción del dsRNAi, por si esto fuera un impedimento para su aplicación *in vivo*. Como vemos en la Tabla V.4 para las secuencias que ya usamos, los SNPs en esta zona en la secuencia 1 no son frecuentes. Llama la atención que en la secuencia 2 hay dos SNPs de más alta frecuencia (4/125568 genomas y 3/125568 genomas respectivamente). Esto podría explicar la menor acción de esta secuencia.

En la Tabla V.5 se muestran las variantes para las secuencias aún no testadas en cultivo (PIAS2 ds RNAi 3-4-5). La secuencia 3 parecería la de mayor probabilidad por su escasez de SNPs.

Esta tesis ha demostrado que PIAS2b es una diana terapéutica específica en carcinoma anaplásico de tiroides. El uso de dsRNAi como tratamiento directo en humanos es controvertido por su inestabilidad, pero actualmente ya existen tratamientos aprobados por la FDA y otros varios en ensayos clínicos. Como alternativa de tratamiento se podría oligos modificados pero que fuesen igualmente efectivos o inhibidores tipo molécula pequeña o péptidos.

Tabla V.4. SNPs descritos en NCBI para los genomas humanos completamente secuenciados para la región de la secuencia PIAS2 dsRNAi 1 y 2. Subrayados los nucleótidos afectados por orden de secuencia.

dsRNAi	Sequence	SNIP	Alleles	Frequency Nº positivos/ Nº genomes Base de Datos	3' UTR Isoforms	
PIAS2b dsRNAi 1	<u>AATAATTT</u> <u>GGTATTT</u> <u>ATTGAA</u>	rs92255 7863	T>A / T>C	C=0.00002 (2/125568, TOPMED)	PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1
		rs12471 31546	C>T	T=0.00001 (1/125568, TOPMED)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1
		rs99489 5676	A>C	C=0.00001 (1/125568, TOPMED)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1
		rs10504 49754	T>A	A=0.0000 (0/25194, GnomAD)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1
PIAS2b dsRNAi 2	<u>AACAAGAA</u> <u>CCAAATGA</u> <u>CATGC</u>	rs95805 0568	T>C	C=0.00003 (4/125568, TOPMED) C=0.0000 (1/30858, GnomAD)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1
		rs54388 4339	T>C	C=0.000 (1/5008, 1000G)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta	NM_001324049.1 NM_004671.4

					PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1
		rs10307 53175	C>T	T=0.00002 (3/125568, TOPMED)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1

Tabla V.5. SNPs descritos en NCBI para los genomas humanos completamente secuenciados para la región de la secuencia PIAS2 dsRNAi 3,4 y 5. Subrayados los nucleótidos afectados por orden de secuencia.

dsRNAi	Sequence	SNIP	Alleles	Frequency Nº positivos/ Nº genomes Base de Datos	3' UTR Isoforms
PIAS2b dsRNAi 3	AATTTGGT ATTTATTG AAAGT	rs12471 31546	C>T	T=0.00001 (1/125568, TOPMED)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27
		rs99489 5676	A>C	C=0.00001 (1/125568, TOPMED)	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1
		rs10504 49754	T>A	A=0.0000 (0/25194, GnomAD)	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1



					PIAS2 transcript variant 27	NM_001354038.1
<b>PIAS2b dsRNAi 4</b>	<b>AACCATAA CTGTATCTT CCTG</b>	rs10144 88312	T>C	C=0.00003 (4/125568, TOPMED) C=0.0001 (2/31360, GnomAD)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1
		rs12379 81747	A>G	G=0.00001 (1/125568, TOPMED)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1
		rs89449 2408	T>C	C=0.00006 (8/125568, TOPMED)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1
<b>PIAS2b dsRNAi 5</b>	<b>AATGGATG GAGTCTAC AAATC</b>	rs10520 39867	A>C / A>G	Position chr18:46812156 G=0.00004 (5/125568, TOPMED) G=0.0001 (2/30908, GnomAD)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1
		rs13351 99131	T>A	A=0.00001 (1/125568, TOPMED)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1
		rs13402 67151	C>T	T=0.00002 (2/125568, TOPMED)	PIAS2 transcript variant 7 PIAS2 transcript variant beta PIAS2 transcript variant 5 PIAS2 transcript variant 6 PIAS2 transcript variant 4 PIAS2 transcript variant 20 PIAS2 transcript variant 19 PIAS2 transcript variant 21 PIAS2 transcript variant 28 PIAS2 transcript variant 27	NM_001324049.1 NM_004671.4 NM_001324047.1 NM_001324048.1 NM_001324046.1 NM_001354035.1 NM_001354034.1 NM_001354036.1 NM_001354039.1 NM_001354038.1



## **VI. RESUMEN DE RESULTADOS**





En conjunto, nuestras investigaciones han demostrado los siguientes resultados:

1. Nuestro estudio de proteómica obtiene como proteína diferencialmente expresada PIAS2. Esta proteína aumenta su expresión en carcinoma diferenciado papilar de tiroides, resultado que hemos validado en una serie de tejidos de diferentes pacientes, y que además coincide con los datos disponibles en el consorcio TCGA para cáncer de tiroides, la mayoría de cuyos casos son carcinomas diferenciados papilares. En aquellas parejas de tejido dónde disponíamos de muestra suficiente para comparar benigno/cáncer del mismo paciente, la isoforma de mRNA de PIAS2 que reproduciblemente y de forma cuantitativamente relevante aumentaba en todos los cánceres era PIAS2 beta, mientras que la isoforma PIAS2 alfa no aumentaba de forma cuantitativamente relevante en la mitad de los casos.

2. Los carcinomas pobremente diferenciados y anaplásicos de tiroides expresan significativamente menos mRNA de PIAS2 tanto en su isoforma alfa como en su isoforma beta. Los carcinomas anaplásicos también presentaban una reducción significativa de todas las isoformas de PIAS2 mientras que el pobremente diferenciado no presentaba diferencias al medir las isoformas en conjunto.

3. Hemos validado dos anticuerpos para estudiar la función de PIAS2.

El primer anticuerpo, monoclonal de ratón anti-PIAS2 (mPIAS2), reconoce las dos isoformas principales PIAS2 beta y alfa puesto que su epítipo es C-terminal, pero en una secuencia común a ambas isoformas, reconoce de forma muy sensible dos constructos de proteína exógena sobreexpresada, reconoce esta sobreexpresión en inmunofluorescencia, y detecta tres bandas de proteína endógena por *western blot* de diferente peso molecular (kDa): p75, p95 y p140, con una banda más a p55. Las tres proteínas superiores aumentan cuando se transfectan exógenamente. Nuestros datos sobre p55 concluyen que sería una proteína procesada para su degradación. Este anticuerpo no funciona en inmunohistoquímica de tejidos parafinados, pero sí en criosecciones.

El segundo anticuerpo, policlonal de conejo anti-PIAS2 (rPIAS2) sólo reconoce la isoforma beta, puesto que su epítipo es C-terminal, pero en el fragmento no común de la isoforma beta. Este anticuerpo reconoce una única banda en *western blot* (kDa), p95, y sólo reconoce las proteínas exógenas cuando se carga mucha cantidad en los westerns. Nuestros estudios sugieren que el epítipo reconoce la cola de serinas fosforilada, por lo que no reconoce la proteína sin fosforilar. Este anticuerpo reconoce en cambio las proteínas exógenas en inmunofluorescencia, y detecta la proteína endógena localizada a nivel nuclear. Tiñe de forma específica la proteína nuclear en inmunohistoquímica de secciones parafinadas.

4. PIAS2 beta es una proteína nuclear tanto en inmunohistoquímica de tejido como en inmunofluorescencia de cultivos y líneas celulares. En *western blot* de líneas celulares y cultivos primarios no se detecta PIAS2 alfa, y parece que la única detectable es PIAS2 beta. Los dos anticuerpos reconocen bandas distintas indicando modificaciones post-traduccionales distintas.

5. La represión de la expresión de PIAS2 beta mediante un RNA inhibitorio transcrito *in vitro* de doble cadena (dsRNA) bloquea de forma efectiva la proliferación de cuatro líneas celulares de carcinoma anaplásico de distinto bagaje genético, y de tres cultivos primarios obtenidos de dos pacientes de carcinoma anaplásico, cuando se compara con la transfección de un dsRNA contra una secuencia sin diana. Este resultado es independiente del reactivo utilizado para la transfección. PIAS2b dsRNA es también efectivo como anti-proliferativo en una línea celular de carcinoma pobremente diferenciado, aunque se debe mezclar más de una secuencia o utilizar una secuencia alternativa. El efecto antiproliferativo se mantiene al menos durante una semana tanto en líneas celulares como en cultivos primarios anaplásicos, a pesar de ser ambos de las células que más se dividen *in vitro*.

6. La represión de la expresión de PIAS2 beta mediante un dsRNA no tiene efecto sobre la proliferación de una línea celular de carcinoma diferenciado folicular de tiroides avanzado, metastásico, ni tampoco

sobre ningún cultivo primario procedente de tejido normal, enfermedad proliferativa benigna o carcinoma diferenciado papilar. En todos estos modelos PIAS2b dsRNA reprimió de forma efectiva la expresión de PIAS2 beta medida tanto en RNA como en proteína.

7. La proteína PIAS2 aumenta en mitosis tanto detectada por *western blot* con mPIAS2 como con rPIAS2.

8. Estudios de identificación de proteínas por espectrometría de masas revelan que, en células anaplásicas, PIAS2 co-inmunoprecipita con una batería de proteínas de forma estadísticamente significativa. De ellas destaca el *cluster* de proteínas de mitosis, incluyendo el *cluster* de segregación del centrosoma. Algunas de estas proteínas han sido confirmadas por estudios de western en inmunoprecipitados de PIAS2, como Aurora kinasa A (AURKA), Tubulina gamma, Tubulina alfa y PP2. Mientras el anticuerpo rPIAS2 detecta un aumento difuso en inmunofluorescencia de células anaplásicas en mitosis, mPIAS2 demuestra que PIAS2 beta es parte del huso mitótico colocalizando con AURKA y Tubulina gamma a lo largo de todas las fases de la mitosis.

9. PIAS2b dsRNA mata de forma cuantitativamente más eficiente a las células anaplásicas sincronizadas en mitosis.

10. PIAS2b dsRNA mata a las células anaplásicas induciendo catástrofe mitótica, fundamentalmente al principio de la mitosis, como lo demuestran nuestros registros de video time-lapse en líneas celulares y cultivos primarios anaplásicos, en combinación con nuestros datos de citometría de flujo. Concordantemente, los inhibidores de apoptosis (caspasas) o necroptosis (RIP1) no alteran el efecto en la acción de PIAS2b dsRNA ya que estos mecanismos de muerte celular son mediados por diferentes vías.

11. En células anaplásicas sincronizadas en mitosis y tratadas con PIAS2b dsRNA, CDK1 (CDC2) está completamente defosforilado (activado) y no existe la desfosforilación de AURKA característica del progreso en mitosis. Sin embargo, hay menos p-Histona H3 y menos Tubulina gamma. La fosfatasa PP2AA (35 kDa) está disminuida en



cantidad y aumenta su fosforilación inhibitoria a un peso modificado de 130 kDa. La fosforilación de PP1A disminuye mientras aumenta la cantidad de PP1A total, indicando mayor actividad global. CDC25C también aumenta. Todas estas modificaciones sugieren una alteración de la entrada en mitosis y parada de la progresión en las primeras etapas.

12. La tinción para Tubulina gamma en células anaplásicas sincronizadas en mitosis y tratadas con PIAS2b dsRNA revela un patrón moteado y persistente en todas las células, y co-localización con p-Histona H3 al contrario de lo que pasa en células tratadas con el control ns-dsRNA. Estos spots de Tubulina gamma también colocan con BUB3, cuya tinción revela patrones alterados como núcleos negativos para BUB3, núcleos condensados, células con dos núcleos o husos mitóticos anormales. Los spots coinciden con el número de kinetocoros. 23, y cada uno está en paralelo con un spot de CREST.

13. Los centrosomas mitóticos teñidos con Pericentrina en células anaplásicas tratadas con PIAS2b dsRNA presentan anomalías en número y, sobre todo, morfológicas como centrosomas desiguales o dispersos (fuzzy).

14. Se ha generado un modelo oPDX, xenotransplante derivado de paciente ortotópico en la tiroides, de carcinoma anaplásico humano en ratones desnudos NOD-SCID. Los cánceres generados son muy agresivos, pero mantienen los marcadores característicos del tejido anaplásico humano como PAX8, Citokeratinas 8/18, p53 (mutado) y Ki67, siendo negativo para los marcadores fenotípicos tiroideos como Tg y TTF1 como pasa en el tejido de los pacientes.

15. El tratamiento intravenoso con PIAS2b dsRNA dos veces por semana, reduce a la mitad el crecimiento del PDX durante las siguientes cuatro semanas. Los tumores tratados presentan significativamente mayor detección de células con signos de catástrofe mitótica (cuerpos condensados con eosina muy marcada y hematoxilina fragmentada).

## VII. CONCLUSIONES





Los datos recabados en esta tesis nos llevan a las siguientes conclusiones:

1. Hemos identificado PIAS2 beta como una proteína característica del cáncer de tiroides diferenciado, pero con expresión limitada en carcinomas avanzados, pobremente diferenciados y anaplásicos.
2. Hemos demostrado que PIAS2 beta es una proteína que participa en la mitosis de las células de cáncer de tiroides anaplásico formando parte del huso mitótico.
3. Hemos desarrollado un agente terapéutico PIAS2b dsRNA que bloquea la proliferación en cáncer anaplásico de tiroides humano mediante la inducción de catástrofe mitótica tanto *in vitro*, en líneas celulares y en cultivos primarios de pacientes, como *in vivo* en un modelo ortotópico de cáncer anaplásico de tiroides. También hemos visto su eficacia en carcinoma pobremente diferenciado.
4. Nuestro agente PIAS2b dsRNA no tiene efectos en células normales humanas de tiroides, ni en células de enfermedades proliferativas benignas ni en carcinoma diferenciado.
5. Nuestros datos indican que el efecto de PIAS2b dsRNA es debido a que interfiere con el comienzo de la mitosis y el establecimiento del huso mitótico.
6. Se propone a PIAS2b dsRNA como una posible terapia anticancerosa para cáncer agresivo en pacientes. Aunque no ofrece remisión completa como agente terapéutico en modelos preclínicos, nuestros datos sugieren que podría ser la más eficaz de todas las conocidas para cáncer anaplásico/indiferenciado e incluso para carcinoma pobremente diferenciado.



## VIII. REFERENCIAS







## Consortiums

- Cellosaurus: version 31, <https://web.expasy.org/cellosaurus/>

Bairoch A. The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. *J Biomol Tech.* 2018 Jul;29(2):25-38.

- Cytoscape: version 3.6.1, <https://cytoscape.org/>

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003 Nov;13(11):2498-504.

- Ensembl: <https://www.ensembl.org>

Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Billis K, Cummins C, Gall A, Girón CG, Gil L, Gordon L, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, To JK, Laird MR, Lavidas I, Liu Z, Loveland JE, Maurel T, McLaren W, Moore B, Mudge J, Murphy DN, Newman V, Nuhn M, Ogeh D, Ong CK, Parker A, Patricio M, Riat HS, Schuilenburg H, Sheppard D, Sparrow H, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Walts B, Zadissa A, Frankish A, Hunt SE, Kostadima M, Langridge N, Martin FJ, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Staines DM, Trevanion SJ, Aken BL, Cunningham F, Yates A, Flicek P. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(D1):D754-D761.

- GPS-SUMO: version 1.0, *Prediction of SUMOylation Sites and SUMO-interaction motifs*, <http://sumosp.biocuckoo.org/>.

Beauclair G, Bridier-Nahmias A, Zagury JF, Saïb A, Zamborlini A. JASSA: a comprehensive tool for prediction of SUMOylation sites and SIMs. *Bioinformatics.* 2015 Nov 1;31(21):3483-91.

- ICLAC: International Cell Line Authentication Committee, version 9, <https://iclac.org/databases/cross-contaminations/>

Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer*. 2010 Jul 1;127(1):1-8.

- IMPC Consortium: *International Mouse Phenotypic Consortium*, <https://www.mousephenotype.org>

Dickinson ME, Flenniken AM, Ji X, Teboul L, Wong MD, White JK, Meehan TF, Weninger WJ, Westerberg H, Adissu H, Baker CN, Bower L, Brown JM, Caddle LB, Chiani F, Clary D, Cleak J, Daly MJ, Denegre JM, Doe B, Dolan ME, Edie SM, Fuchs H, Gailus-Durner V, Galli A, Gambadoro A, Gallegos J, Guo S, Horner NR, Hsu CW, Johnson SJ, Kalaga S, Keith LC, Lanoue L, Lawson TN, Lek M, Mark M, Marschall S, Mason J, McElwee ML, Newbigging S, Nutter LM, Peterson KA, Ramirez-Solis R, Rowland DJ, Ryder E, Samocha KE, Seavitt JR, Selloum M, Szoke-Kovacs Z, Tamura M, Trainor AG, Tudose I, Wakana S, Warren J, Wendling O, West DB, Wong L, Yoshiki A; International Mouse Phenotyping Consortium; Jackson Laboratory; Infrastructure Nationale PHENOMIN, Institut Clinique de la Souris (ICS); Charles River Laboratories; MRC Harwell; Toronto Centre for Phenogenomics; Wellcome Trust Sanger Institute; RIKEN BioResource Center, MacArthur DG, Tocchini-Valentini GP, Gao X, Flicek P, Bradley A, Skarnes WC, Justice MJ, Parkinson HE, Moore M, Wells S, Braun RE, Svenson KL, de Angelis MH, Herault Y, Mohun T, Mallon AM, Henkelman RM, Brown SD, Adams DJ, Lloyd KC, McKerlie C, Beaudet AL, Bućan M, Murray SA. High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature*. 2016 Sep 22;537(7621):508-514.

- JASSA: version 4, *Joined Advanced Sumoylation Site and Sim Analyser*, <http://www.jassa.fr>.

Zhao X. SUMO-Mediated Regulation of Nuclear Functions and Signaling Processes. *Mol Cell*. 2018 Aug 2;71(3):409-418.

- NCBI: *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

BLAST/NCBI: *Basic Local Alignment Search Tool*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Sayers EW, Agarwala R, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Clark K, Connor R, Fiorini N, Funk K, Hefferon T, Holmes JB, Kim S, Kimchi A, Kitts PA, Lathrop S, Lu Z, Madden TL, Marchler-Bauer A, Phan L, Schneider VA, Schoch CL, Pruitt KD, Ostell J. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D23-D28.

- Reactome Knowledgebase: version 68, <https://reactome.org>

Fabregat A, Jupe S, Matthews L, Sidiropoulos K, Gillespie M, Garapati P, Haw R, Jassal B, Korninger F, May B, Milacic M, Roca CD, Rothfels K, Sevilla C, Shamovsky V, Shorser S, Varusai T, Viteri G, Weiser J, Wu G, Stein L, Hermjakob H, D'Eustachio P. The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(D1):D649-D655.

- STRING: version 11, <http://string-db.org>

Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D447-52.

- TCGA: *The Cancer Genome Atlas*, <https://portal.gdc.cancer.gov/expuestos> en HPA: *Human Protein Atlas*, [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)

Uhlen M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigarty CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von

Heijne G, Nielsen J, Pontén F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015 Jan 23;347(6220):1260419.

Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, Benfeitas R, Arif M, Liu Z, Edfors F, Sanli K, von Feilitzen K, Oksvold P, Lundberg E, Hober S, Nilsson P, Mattsson J, Schwenk JM, Brunnström H, Glimelius B, Sjöblom T, Edqvist PH, Djureinovic D, Micke P, Lindskog C, Mardinoglu A, Ponten F. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017 Aug 18;357(6352).

Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, Alm T, Asplund A, Björk L, Breckels LM, Bäckström A, Danielsson F, Fagerberg L, Fall J, Gatto L, Gnann C, Hober S, Hjelmare M, Johansson F, Lee S, Lindskog C, Mulder J, Mulvey CM, Nilsson P, Oksvold P, Rockberg J, Schutten R, Schwenk JM, Sivertsson Å, Sjöstedt E, Skogs M, Stadler C, Sullivan DP, Tegel H, Winsnes C, Zhang C, Zwahlen M, Mardinoglu A, Pontén F, von Feilitzen K, Lilley KS, Uhlén M, Lundberg E. A subcellular map of the human proteome. *Science*. 2017 May 26;356(6340).

- UniProt Consortium: <https://www.uniprot.org/uniprot>

UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D506-D515.

## Manuales

Ambion, Silencer® siRNA construction kit manual. <https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/1620ME.pdf> (Ambion absorbida por Life Technologies Corporation, ahora Thermo Fisher Scientific).

Dharmacon, Inducible Dharmacon™ TRIPZ™ Lentiviral shRNA manual. <https://dharmacon.horizondiscovery.com/uploadedFiles/Resources/ptripz-inducible-lentiviral-manual.pdf>.

Exiqon, [www.exiqon.com/ls/Documents/Scientific/ExiqonInVivoGuidelines.pdf](http://www.exiqon.com/ls/Documents/Scientific/ExiqonInVivoGuidelines.pdf)



Acquaviva G, Visani M, Repaci A, Rhoden KJ, de Biase D, Pession A, Giovanni T. Molecular pathology of thyroid tumours of follicular cells: a review of genetic alterations and their clinicopathological relevance. *Histopathology*. 2018;72(1):6-31.

Acs K, Luijsterburg MS, Ackermann L, Salomons FA, Hoppe T, Dantuma NP. The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Nov 27;18(12):1345-50.

Afonso O, Matos I, Pereira AJ, Aguiar P, Lampson MA, Maiato H. Feedback control of chromosome separation by a midzone Aurora B gradient. *Science*. 2014 Jul 18;345(6194):332-336.

Agaimy A, Daum O, Märkl B, Lichtmanegger I, Michal M, Hartmann A. SWI/SNF Complex-deficient Undifferentiated/Rhabdoid Carcinomas of the Gastrointestinal Tract: A Series of 13 Cases Highlighting Mutually Exclusive Loss of SMARCA4 and SMARCA2 and Frequent Co-inactivation of SMARCB1 and SMARCA2. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(4):544-53

Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA et al. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014; 159:676-90.

Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 Dec;67(4):657-85. Review.

Akinc A, Zumbuehl A, Goldberg M, Leshchiner ES, Busini V, Hossain N, Bacallado SA, Nguyen DN, Fuller J, Alvarez R, Borodovsky A, Borland T, Constien R, de Fougères A, Dorkin JR, Narayanannair Jayaprakash K, Jayaraman M, John M, Koteliensky V, Manoharan M, Nechev L, Qin J, Racie T, Raitcheva D, Rajeev KG, Sah DW, Soutschek J, Toudjarska I, Vornlocher HP, Zimmermann TS, Langer

R, Anderson DG. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol.* 2008 May;26(5):561-9.

Akslen LA, Myking AO, Salvesen H, et al. Prognostic importance of various clinicopathological features in papillary thyroid carcinoma. *Eur J Cancer.* 1992;29A:44–51

Alharbi AM, De Marzo AM, Hicks JL, Lotan TL, Epstein JI. Prostatic Adenocarcinoma With Focal Pleomorphic Giant Cell Features: A Series of 30 Cases. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(10):1286-1296.

Ali MM, Akhade VS, Kosalai ST, Subhash S, Statello L, Meryet-Figuire M, Abrahamsson J, Mondal T, Kanduri C. PAN-cancer analysis of S-phase enriched lncRNAs identifies oncogenic drivers and biomarkers. *Nat Commun.* 2018 Feb 28;9(1):883.

Alvarez-Fernández M, Malumbres M. Preparing a cell for nuclear envelope breakdown: Spatio-temporal control of phosphorylation during mitotic entry. *Bioessays.* 2014 Aug;36(8):757-65.

An DS, Qin FX, Auyeung VC, Mao SH, Kung SK, Baltimore D, Chen IS. Optimization and functional effects of stable short hairpin RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors. *Mol Ther.* 2006 Oct;14(4):494-504.

An T, Liu Y, Gourguechon S, Wang CC, Li Z. CDK Phosphorylation of Translation Initiation Factors Couples Protein Translation with Cell-Cycle Transition. *Cell Rep.* 2018 Dec 11;25(11):3204-3214.e5.

Andrews JL, Goodfellow FJ, Matosin N, Snelling MK, Newell KA, Huang XF, Fernandez-Enright F. Alterations of ubiquitin related proteins in the pathology and development of schizophrenia: Evidence from human and animal studies. *J Psychiatr Res.* 2017 Jul;90:31-39.

Arcasoy SM, Latoche J, Gondor M, Watkins SC, Henderson RA, Hughey R, Finn OJ, Pilewski JM. MUC1 and other sialoglycoconjugates inhibit adenovirus-mediated gene transfer to epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Oct;17(4):422-35.



Archambault V, Glover DM. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Apr;10(4):265-75.

Arnaoutov A, Azuma Y, Ribbeck K, Joseph J, Boyarchuk Y, Karpova T, McNally J, Dasso M. Crm1 is a mitotic effector of Ran-GTP in somatic cells. *Nat Cell Biol.* 2005 Jun;7(6):626-32.

Arora T, Liu B, He H, Kim J, Murphy TL, Murphy KM, Modlin RL, Shuai K. PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem.* 2003 Jun 13;278(24):21327-30.

Asioli S, Erickson LA, Righi A, Jin L, Volante M, Jenkins S, Papotti M, Bussolati G, Lloyd RV. Poorly differentiated carcinoma of the thyroid: validation of the Turin proposal and analysis of IMP3 expression. *Mod Pathol.* 2010;23(9):1269-78.

Avery-Kiejda KA, Braye SG, Forbes JF, Scott RJ. The expression of Dicer and Drosha in matched normal tissues, tumours and lymph node metastases in triple negative breast cancer. *BMC Cancer.* 2014 Apr 11;14:253.

Azuma K, Nakashiro K, Sasaki T, Goda H, Onodera J, Tanji N, Yokoyama M, Hamakawa H. Anti-tumor effect of small interfering RNA targeting the androgen receptor in human androgen-independent prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1;391(1):1075-9.

Azuma Y, Arnaoutov A, Anan T, Dasso M. PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes. *EMBO J.* 2005 Jun 15;24(12):2172-82.

Bachant J, Alcasabas A, Blat Y, Kleckner N, Elledge SJ. The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell.* 2002 Jun;9(6):1169-82.

Bahe S, Stierhof YD, Wilkinson CJ, Leiss F, Nigg EA. Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *J Cell Biol.* 2005 Oct 10;171(1):27-33.

Bai S, Baloch ZW, Samulski TD, Montone KT, LiVolsi VA. Poorly differentiated oncocytic (hürthle cell) follicular carcinoma: an institutional experience. *Endocr Pathol.* 2015;26(2):164-9.

Baldini E, D'Armiento M, Ulisse S. A new aurora in anaplastic thyroid cancer therapy. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:816430.

Barczák W, Suchorska W, Rubiś B, Kulcenty K. Universal real-time PCR-based assay for lentiviral titration. *Mol Biotechnol.* 2015 Feb;57(2):195-200.

Barr FA, Elliott PR, Gruneberg U. Protein phosphatases and the regulation of mitosis. *J Cell Sci.* 2011 Jul 15;124(Pt 14):2323-34.

Barr FA, Gruneberg U. Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):847-60. Review.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97. Review.

Bartlett DW, Su H, Hildebrandt IJ, Weber WA, Davis ME. Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Sep 25;104(39):15549-54.

Bastman JJ, Serracino HS, Zhu Y, Koenig MR, Mateescu V, Sams SB, Davies KD, Raeburn CD, McIntyre RC Jr, Haugen BR, French JD. Tumor-Infiltrating T Cells and the PD-1 Checkpoint Pathway in Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Jul;101(7):2863-73.

Bastos RN, Barr FA. Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission. *J Cell Biol.* 2010 Nov 15;191(4):751-60.

Bayliss R, Sardon T, Vernos I, Conti E. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell*. 2003 Oct;12(4):851-62.

Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010; 50:259-93.

Berezchnoy A, Castro I, Levay A, Malek TR, Gilboa E. Aptamer-targeted inhibition of mTOR in T cells enhances antitumor immunity. *J Clin Invest*. 2014 Jan;124(1):188-97.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001 Jan18;409(6818):363-6.

Bhutta MS, McNerny CJ, Gould GW. ESCRT function in cytokinesis: location, dynamics and regulation by mitotic kinases. *Int J Mol Sci*. 2014 Nov 25;15(12):21723-39.

Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilesley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall WS, Khvorova A. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods*. 2006 Mar;3(3):199-204.

Bishop JA, Sharma R, Westra WH. PAX8 immunostaining of anaplastic thyroid carcinoma: a reliable means of discerning thyroid origin for undifferentiated tumors of the head and neck. *Hum Pathol*. 2011;42(12):1873-7.

Bjursell G, Reichard P. Effects of thymidine on deoxyribonucleoside triphosphate pools and deoxyribonucleic acid synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 1973 Jun 10;248(11):3904-9.

Bollen M, Gerlich DW, Lesage B. Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides. *Trends Cell Biol*. 2009 Oct;19(10):531-41.

Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, Corset V, Bidaud C, Billaud M, Bredesen DE, Edery P, Mehlen P. The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J*. 2000 Aug 1;19(15):4056-63.

Bostock CJ, Prescott DM, Kirkpatrick JB. An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. *Exp Cell Res*. 1971 Sep;68(1):163-8.

Checkpoint Pathway. *N Engl J Med*. 2016 Nov 3;375(18):1767-1778. Review.

Bravo SB, Caminos JE, González CR, Vázquez MJ, Garcés MF, Cepeda LA, García-Rendueles ME, Iglesias-Gamarra A, Gómez-Díaz C, Lopez M, Castaño JP, Diéguez C, Nogueiras R. Leptin and fasting regulate rat gastric glucose-regulated protein 58. *Int J Pept*. 2011;2011:969818.

Bravo SB, Garcia-Rendueles ME, Garcia-Rendueles AR, Rodrigues JS, Perez-Romero S, Garcia-Lavandeira M, Suarez-Fariña M, Barreiro F, Czarnocka B, Senra A, Lareu MV, Rodriguez-Garcia J, Cameselle-Teijeiro J, Alvarez CV. Humanized medium (h7H) allows long-term primary follicular thyroid cultures from human normal thyroid, benign neoplasm, and cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jun;98(6):2431-41.

Bravo SB, Garcia-Rendueles ME, Perez-Romero S, Cameselle-Teijeiro J, Rodrigues JS, Barreiro F, Alvarez CV. Expression of exogenous proteins and short hairpin RNAs in human primary thyrocytes. *Anal Biochem*. 2010 May 15;400(2):219-28.

Brignardello E, Gallo M, Baldi I, Palestini N, Piovesan A, Grossi E, Ciccone G, Boccuzzi G. Anaplastic thyroid carcinoma: clinical outcome of 30 consecutive patients referred to a single institution in the past 5 years. *Eur J Endocrinol*. 2007;156(4):425-30.

Brose MS, Cabanillas ME, Cohen EE, Wirth LJ, Riehl T, Yue H, Sherman SI, Sherman EJ. Vemurafenib in patients with BRAF(V600E)-positive metastatic or unresectable papillary thyroid cancer refractory to radioactive iodine: a non-randomised, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Sep;17(9):1272-82.

Brose MS, Nutting CM, Jarzab B, Elisei R, Siena S, Bastholt L, de la Fouchardiere C, Pacini F, Paschke R, Shong YK, Sherman SI, Smit JW, Chung J, Kappeler C, Peña C, Molnár I, Schlumberger MJ; DECISION investigators. Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet.* 2014 Jul 26;384(9940):319-28.

Bruinsma W, Raaijmakers JA, Medema RH. Switching Polo-like kinase-1 on and off in time and space. *Trends Biochem Sci.* 2012 Dec;37(12):534-42.

Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem Biol.* 2012 Jan 27;19(1):60-71.

Buzzoni C, Crocetti E, Guzzinati S, Dal Maso L, Francisci S; AIRTUM Working Group. Cancer incidence and mortality trends from 2003 to 2014 in Italy. *Tumori.* 2019;105(2):121-137.

Byrne AT, Alférez DG, Amant F, Annibali D, Arribas J, Biankin AV, Bruna A, Budinská E, Caldas C, Chang DK, Clarke RB, Clevers H, Coukos G, Dangles-Marie V, Eckhardt SG, Gonzalez-Suarez E, Hermans E, Hidalgo M, Jarzabek MA, de Jong S, Jonkers J, Kemper K, Lanfranccone L, Mælandsmo GM, Marangoni E, Marine JC, Medico E, Norum JH, Palmer HG, Peeper DS, Pelicci PG, Piris-Gimenez A, Roman-Roman S, Rueda OM, Seoane J, Serra V, Soucek L, Vanhecke D, Villanueva A, Vinolo E, Bertotti A, Trusolino L. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nat Rev Cancer.* 2017 Apr;17(4):254-268.

Cabanillas ME, de Souza JA, Geyer S, Wirth LJ, Menefee ME, Liu SV, Shah K, Wright J, Shah MH. Cabozantinib As Salvage Therapy for

Patients With Tyrosine Kinase Inhibitor-Refractory Differentiated Thyroid Cancer: Results of a Multicenter Phase II International Thyroid Oncology Group Trial. *J Clin Oncol*. 2017 Oct 10;35(29):3315-3321.

Cabanillas ME, McFadden DG, Durante C. Thyroid cancer. *Lancet*. 2016 Dec 3;388(10061):2783-2795.

Cabanillas ME, Ryder M, Jimenez C. Targeted Therapy for Advanced Thyroid Cancer: Kinase Inhibitors and Beyond. *Endocr Rev*. 2019 Jul 19.

Cabanillas ME, Ryder M, Jimenez C. Targeted Therapy for Advanced Thyroid Cancer: Kinase Inhibitors and Beyond. *Endocr Rev*. 2019 Jul 19.

Caldas GV, DeLuca JG. KNL1: bringing order to the kinetochore. *Chromosoma*. 2014 Jun;123(3):169-81.

Cameselle-Teijeiro J, Varela-Durán J, Sambade C, Villanueva JP, Varela-Núñez R, Sobrinho-Simoes M. Solid cell nests of the thyroid: light microscopy and immunohistochemical profile. *Hum Pathol*. 1994;25(7):684-93.

Cameselle-Teijeiro JM, Peteiro-González D, Caneiro-Gómez J, Sánchez-Ares M, Abdulkader I, Eloy C, Melo M, Amendoeira I, Soares P, Sobrinho-Simões M. Cribriform-morular variant of thyroid carcinoma: a neoplasm with distinctive phenotype associated with the activation of the WNT/ $\beta$ -catenin pathway. *Mod Pathol*. 2018;31(8):1168-1179.

Campla CK, Breit H, Dong L, Gumerson JD, Roger JE, Swaroop A. Pias3 is necessary for dorso-ventral patterning and visual response of retinal cones but is not required for rod photoreceptor differentiation. *Biol Open*. 2017 Jun 15;6(6):881-890.

Cañibano C, Rodriguez NL, Saez C, Tovar S, Garcia-Lavandeira M, Borrello MG, Vidal A, Costantini F, Japon M, Dieguez C, Alvarez CV. The dependence receptor Ret induces apoptosis in somatotrophs

through a Pit-1/p53 pathway, preventing tumor growth. *EMBO J.* 2007 Apr 18;26(8):2015-28.

Cantara S, Bertelli E, Occhini R, Regoli M, Brilli L, Pacini F, Castagna MG, Toti P. Blockade of the programmed death ligand 1 (PD-L1) as potential therapy for anaplastic thyroid cancer. *Endocrine.* 2019;64(1):122-129.

Capdevila J, Mayor R, Mancuso FM, Iglesias C, Caratù G, Matos I, Zafón C, Hernando J, Petit A, Nuciforo P, Cameselle-Teijeiro JM, Álvarez C, Recio JA, Tabernero J, Matias-Guiu X, Vivancos A, Seoane J. Early evolutionary divergence between papillary and anaplastic thyroid cancers. *Ann Oncol.* 2018;29(6):1454-1460.

Carcangiu ML, Zampi G, Rosai J. Poorly differentiated ("insular") thyroid carcinoma. A reinterpretation of Langhans' "wuchernde Struma". *Am J Surg Pathol.* 1984;8(9):655-68.

Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC. The chromosomal Passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Dec;13(12):789-803.

Carvalho S, Ribeiro SA, Arocena M, Kasciukovic T, Temme A, Koehler K, Huebner A, Griffis ER. The nucleoporin ALADIN regulates Aurora A localization to ensure robust mitotic spindle formation. *Mol Biol Cell.* 2015 Oct 1;26(19):3424-38.

Casenghi M, Meraldi P, Weinhart U, Duncan PI, Körner R, Nigg EA. Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell.* 2003 Jul;5(1):113-25.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2825-37. Review.

Chambers, J, Cleveland, W, Kleiner, B, Tukey, P. Graphical methods for data analysis. Pacific Grove, California: Wadsworth & Brooke/Cole Publ; 1983. 395 p.



Chan EH, Santamaria A, Silljé HH, Nigg EA. Plk1 regulates mitotic Aurora A function through betaTrCP-dependent degradation of hBora. *Chromosoma*. 2008 Oct;117(5):457-69.

Chan JH, Lim S, Wong WS. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006 May-Jun;33(5-6):533-40. Review.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2507-16.

Cheeseman IM, Chappie JS, Wilson-Kubalek EM, Desai A. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell*. 2006 Dec 1;127(5):983-97.

Chen G, Deng X. Cell Synchronization by Double Thymidine Block. *Bio Protoc*. 2018 Sep 5;8(17).

Chen TC, Lin KT, Chen CH, Lee SA, Lee PY, Liu YW, Kuo YL, Wang FS, Lai JM, Huang CY. Using an in situ proximity ligation assay to systematically profile endogenous protein-protein interactions in a pathway network. *J Proteome Res*. 2014 Dec 5;13(12):5339-46.

Chenlo M, Rodriguez-Gomez IA, Serramito R, Garcia-Rendueles AR, Villar-Taibo R, Fernandez-Rodriguez E, Perez-Romero S, Suarez-Fariña M, Garcia-Allut A, Cabezas-Agricola JM, Rodriguez-Garcia J, Lear PV, Alvarez-San Martin RM, Alvarez-Escola C, Bernabeu I, Alvarez CV. Unmasking a new prognostic marker and therapeutic target from the GDNF-RET/PIT1/p14ARF/p53 pathway in acromegaly. *EBioMedicine*. 2019 May;43:537-552.

Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc J.* 2016 Jul;4(7):35-50.

Chesneau L, Dambournet D, Machicoane M, Kouranti I, Fukuda M, Goud B, Echard A. An ARF6/Rab35 GTPase cascade for endocytic recycling and successful cytokinesis. *Curr Biol.* 2012 Jan 24;22(2):147-53.

Chindris AM, Casler JD, Bernet VJ, Rivera M, Thomas C, Kachergus JM, Necela BM, Hay ID, Westphal SA, Grant CS, Thompson GB, Schlinkert RT, Thompson EA, Smallridge RC. Clinical and molecular features of Hürthle cell carcinoma of the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(1):55-62.

Choi H, Charnsangavej C, de Castro Faria S, Tamm EP, Benjamin RS, Johnson MM, Macapinlac HA, Podoloff DA. CT evaluation of the response of gastrointestinal stromal tumors after imatinib mesylate treatment: a quantitative analysis correlated with FDG PET findings. *AJR Am J Roentgenol.* 2004 Dec;183(6):1619-28.

Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR, Chen LL, Podoloff DA, Benjamin RS. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *J Clin Oncol.* 2007 May 1;25(13):1753-9.

Chowdhury D, Singh A, Gupta A, Tulsawani R, Meena RC, Chakrabarti A. p38 MAPK pathway-dependent SUMOylation of Elk-1 and phosphorylation of PIAS2 correlate with the downregulation of Elk-1 activity in heat-stressed HeLa cells. *Cell Chaperones.* 2019 Mar;24(2):393-407

Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science.* 1997 Dec 5;278(5344):1803-5.

Clifford DM, Chen CT, Roberts RH, Feoktistova A, Wolfe BA, Chen JS, McCollum D, Gould KL. The role of Cdc14 phosphatases in the control of cell division. *Biochem Soc Trans.* 2008 Jun;36(Pt 3):436-8.

Cohen EE, Rosen LS, Vokes EE, Kies MS, Forastiere AA, Worden FP, Kane MA, Sherman E, Kim S, Bycott P, Tortorici M, Shalinsky DR, Liao KF, Cohen RB. Axitinib is an active treatment for all histologic subtypes of advanced thyroid cancer: results from a phase II study. *J Clin Oncol.* 2008 Oct 10;26(29):4708-13.

Cohen PT, Cohen P. Discovery of a protein phosphatase activity encoded in the genome of bacteriophage lambda. Probable identity with open reading frame 221. *Biochem J.* 1989 Jun 15;260(3):931-4.

Constanzo JD, Deng M, Rindhe S, Tang KJ, Zhang CC, Scaglioni PP. *Pias1* is essential for erythroid and vascular development in the mouse embryo. *Dev Biol.* 2016 Jul 1;415(1):98-110.

Cornett WR, Sharma AK, Day TA, Richardson MS, Hoda RS, van Heerden JA, Fernandes JK. Anaplastic thyroid carcinoma: an overview. *Curr Oncol Rep.* 2007;9(2):152-8.

Cronin KA, Lake AJ, Scott S, Sherman RL, Noone AM, Howlader N, Henley SJ, Anderson RN, Firth AU, Ma J, Kohler BA, Jemal A. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer.* 2018 Jul 1;124(13):2785-2800.

Crooke ST, Geary RS. Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Br J Clin Pharmacol.* 2013 Aug;76(2):269-76.

Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 10;1489(1):31-44. Review.

Crooke ST. Progress in antisense technology: the end of the beginning. *Methods Enzymol.* 2000; 313:3-45. Review.

Crowley LC, Marfell BJ, Waterhouse NJ. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Sep 1;2016(9).

Cubeñas-Potts C, Goeres JD, Matunis MJ. SENP1 and SENP2 affect spatial and temporal control of sumoylation in mitosis. *Mol Biol Cell.* 2013 Nov;24(22):3483-95.

Cubeñas-Potts C, Srikumar T, Lee C, Osula O, Subramonian D, Zhang XD, Cotter RJ, Raught B, Matunis MJ. Identification of SUMO-2/3-modified proteins associated with mitotic chromosomes. *Proteomics.* 2015 Feb;15(4):763-72.

Dahm HH. Immunohistochemical evaluation of a sarcomatoid hepatocellular carcinoma with osteoclastlike giant cells. *Diagn Pathol.* 2015;10:40.

Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, Mehmandoost N, Moazzen F, Mazraeh A, Marmari V, Ebrahimi M, Rashno MM, Abadi SJ, Gharagouzlo E. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci.* 2017 Jun;13(2):48-57. Review.

Dark GG, Hill SA, Prise VE, Tozer GM, Pettit GR, Chaplin DJ. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Res.* 1997 May 15;57(10):1829-34.

Dasso M. Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis. *Cell Div.* 2008 Jan 24; 3:5.

Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA.* 2006 May 10;295(18):2164-7.

Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD, Ribas A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature.* 2010 Apr 15;464(7291):1067-70.

de Carvalho CE, Colaiácovo MP. SUMO-mediated regulation of synaptonemal complex formation during meiosis. *Genes Dev.* 2006 Aug 1;20(15):1986-92.

Della Monica R, Visconti R, Cervone N, Serpico AF, Grieco D. Fcp1 phosphatase controls Greatwall kinase to promote PP2A-B55 activation and mitotic progression. *Elife.* 2015 Dec 14;4.

DeLuca JG, Musacchio A. Structural organization of the kinetochore-microtubule interface. *Curr Opin Cell Biol.* 2012 Feb;24(1):48-56.

Denning W, Das S, Guo S, Xu J, Kappes JC, Hel Z. Optimization of the transductional efficiency of lentiviral vectors: effect of sera and polycations. *Mol Biotechnol.* 2013 Mar;53(3):308-14.

Dephoure N, Zhou C, Villén J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Aug 5;105(31):10762-7.

Deracinois B, Flahaut C, Duban-Deweer S, Karamanos Y. Comparative and Quantitative Global Proteomics Approaches: An Overview. *Proteomes.* 2013 Oct 1;1(3):180-218.

Dettmer M, Schmitt A, Steinert H, Haldemann A, Meili A, Moch H, Komminoth P, Perren A. Poorly differentiated thyroid carcinomas: how much poorly differentiated is needed? *Am J Surg Pathol.* 2011;35(12):1866-72.

Dettmer M, Schmitt A, Steinert H, Moch H, Komminoth P, Perren A. Poorly differentiated oncocytic thyroid carcinoma--diagnostic implications and outcome. *Histopathology.* 2012;60(7):1045-51.

Díaz-Martínez LA, Giménez-Abián JF, Azuma Y, Guacci V, Giménez-Martín G, Lanier LM, Clarke DJ. PIASgamma is required for faithful chromosome segregation in human cells. *PLoS One.* 2006 Dec 20;1:e53.

Domingo-Sananes MR, Kapuy O, Hunt T, Novak B. Switches and latches: a biochemical tug-of-war between the kinases and phosphatases that control mitosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011 Dec 27;366(1584):3584-94.

Dominguez-Brauer C, Thu KL, Mason JM, Blaser H, Bray MR, Mak TW. Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies. *Mol Cell*. 2015 Nov 19;60(4):524-36.

Dominska M, Dykxhoorn DM. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J Cell Sci*. 2010 Apr 15;123(Pt 8):1183-9.

Earnshaw WC, Bernat RL. Chromosomal passengers: toward an integrated view of mitosis. *Chromosoma*. 1991 Mar;100(3):139-46.

Eggert US, Mitchison TJ, Field CM. Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:543-66. Review.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009 Jan;45(2):228-47.

El Dika I, Lim HY, Yong WP, Lin CC, Yoon JH, Modiano M, Freilich B, Choi HJ, Chao TY, Kelley RK, Brown J, Knox J, Ryoo BY, Yau T, Abou-Alfa GK. An Open-Label, Multicenter, Phase I, Dose Escalation Study with Phase II Expansion Cohort to Determine the Safety, Pharmacokinetics, and Preliminary Antitumor Activity of Intravenous TKM-080301 in Subjects with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Oncologist*. 2019 Jun;24(6):747-e218.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001 May 24;411(6836):494-8.

Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*. 2001 Dec 3;20(23):6877-88.

Eriksson S, Thelander L, Akerman M. Allosteric regulation of calf thymus ribonucleoside diphosphate reductase. *Biochemistry*. 1979 Jul 10;18(14):2948-52.

Espeut J, Cheerambathur DK, Krenning L, Oegema K, Desai A. Microtubule binding by KNL-1 contributes to spindle checkpoint silencing at the kinetochore. *J Cell Biol*. 2012 Feb 20;196(4):469-82.

Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*. 2007 Jun;27(11):3970-81.

Fagin JA, Wells SA Jr. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Dec 8;375(23):2307.

Fazil MH, Ong ST, Chalasani ML, Low JH, Kizhakeyil A, Mamidi A, Lim CF, Wright GD, Lakshminarayanan R, Kelleher D, Verma NK. GapmeR cellular internalization by macropinocytosis induces sequence-specific gene silencing in human primary T-cells. *Sci Rep*. 2016 Nov 24;6: 37721.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Nov;84(21):7413-7.

Ferrari SM, La Motta C, Elia G, Ragusa F, Ruffilli I, Quattrini L, Paparo SR, Piaggi S, Patrizio A, Ulisse S, Baldini E, Materazzi G, Fallahi P, Antonelli A. Antineoplastic Effect of Lenvatinib and Vandetanib in Primary Anaplastic Thyroid Cancer Cells Obtained From Biopsy or Fine Needle Aspiration. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9:764.



Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.

Flotho A, Melchior F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem*. 2013; 82:357-85. Review.

Foley EA, Kapoor TM. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Jan;14(1):25-37. Review.

Foley EA, Maldonado M, Kapoor TM. Formation of stable attachments between kinetochores and microtubules depends on the B56-PP2A phosphatase. *Nat Cell Biol*. 2011 Aug 28;13(10):1265-71.

Fontanellas A, Ávila MA, Anderson KE, Deybach JC. Current and innovative emerging therapies for porphyrias with hepatic involvement. *J Hepatol*. 2019 Aug;71(2):422-433.

Fournier L, Bellucci A, Vano Y, Bouaboula M, Thibault C, Elaidi R, Oudard S, Cuenod C. Imaging Response of Antiangiogenic and Immune-Oncology Drugs in Metastatic Renal Cell Carcinoma (mRCC): Current Status and Future Challenges. *Kidney Cancer*. 2017 Nov 27;1(2):107-114.

Friberg TR, Tolentino M; LEVEL Study Group, Weber P, Patel S, Campbell S, Goldbaum M. Pegaptanib sodium as maintenance therapy in neovascular age-related macular degeneration: the LEVEL study. *Br J Ophthalmol*. 2010 Dec;94(12):1611-7.

Fu J, Xiong Y, Xu Y, Cheng G, Tang H. MDA5 is SUMOylated by PIAS2 $\beta$  in the upregulation of type I interferon signaling. *Mol Immunol*. 2011 Jan;48(4):415-22.

Funabiki H, Wynne DJ. Making an effective switch at the kinetochore by phosphorylation and dephosphorylation. *Chromosoma*. 2013 Jun;122(3):135-58.

Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, Polo S, Miller KM, Jackson SP. Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature*. 2009 Dec 17;462(7275):935-9.

Galluzzi L, Vitale I, [j] , Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018 Mar;25(3):486-541.

Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature*. 2009 Jul 9;460(7252):278-82.

Ganly I, Ricarte Filho J, Eng S, Ghossein R, Morris LG, Liang Y, Socci N, Kannan K, Mo Q, Fagin JA, Chan TA. Genomic dissection of Hurthle cell carcinoma reveals a unique class of thyroid malignancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(5): E962-72.

Garber K. Alnylam terminates revusiran program, stock plunges. *Nat Biotechnol*. 2016 Dec 7;34(12):1213-1214.

Garcia BA, Barber CM, Hake SB, Ptak C, Turner FB, Busby SA, Shabanowitz J, Moran RG, Allis CD, Hunt DF. Modifications of human histone H3 variants during mitosis. *Biochemistry*. 2005 Oct 4;44(39):13202-13.

Garcia-Rendueles AR, Rodrigues JS, Garcia-Rendueles ME, Suarez-Fariña M, Perez-Romero S, Barreiro F, Bernabeu I, Rodriguez-Garcia J, Fugazzola L, Sakai T, Liu F, Cameselle-Teijeiro J, Bravo SB, Alvarez CV. Rewiring of the apoptotic TGF- $\beta$ -SMAD/NF $\kappa$ B pathway through an oncogenic function of p27 in human papillary thyroid cancer. *Oncogene*. 2017 Feb 2;36(5):652-666.

Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, Wu R, Carcangiu ML, Costa J, Tallini G. ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(17):3226-35.

Garibaldi F, Falcone E, Trisciuoglio D, Colombo T, Lisek K, Walerych D, Del Sal G, Paci P, Bossi G, Piaggio G, Gurtner A. Mutant p53 inhibits miRNA biogenesis by interfering with the microprocessor complex. *Oncogene*. 2016 Jul 21;35(29):3760-70.

Garritano S, Inga A, Gemignani F, Landi S. More targets, more pathways and more clues for mutant p53. *Oncogenesis*. 2013 Jul 1;2:e54.

Gary DJ, Puri N, Won YY. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J Control Release*. 2007 Aug 16;121(1-2):64-73.

Gassmann R, Holland AJ, Varma D, Wan X, Civril F, Cleveland DW, Oegema K, Salmon ED, Desai A. Removal of Spindly from microtubule-attached kinetochores controls spindle checkpoint silencing in human cells. *Genes Dev*. 2010 May;24(9):957-71.

Gautschi O, Heighway J, Mack PC, Purnell PR, Lara PN Jr, Gandara DR. Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 15;14(6):1639-48.

Gavrilov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med*. 2012 Jun;85(2):187-200.

Gharbi-Ayachi A, Labbé JC, Burgess A, Vigneron S, Strub JM, Brioude E, Van-Dorsselaer A, Castro A, Lorca T. The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *Science*. 2010 Dec 17;330(6011):1673-7.

Gioanni J, Zanghellini E, Mazeau C, Zhang D, Courdi A, Farges M, Lambert JC, Duplay H, Schneider M. [Characterization of a human cell line from an anaplastic carcinoma of the thyroid gland]. *Bull Cancer*. 1991 Nov;78(11):1053-62. French.

Giubettini M, Asteriti IA, Scrofani J, De Luca M, Lindon C, Lavia P, Guarguaglini G. Control of Aurora-A stability through interaction with TPX2. *J Cell Sci.* 2011 Jan 1;124(Pt 1):113-22.

Gnemmi V, Renaud F, Do Cao C, Salleron J, Lion G, Wemeau JL, Copin MC, Carnaille B, Leteurtre E, Pattou F, Aubert S. Poorly differentiated thyroid carcinomas: application of the Turin proposal provides prognostic results similar to those from the assessment of high-grade features. *Histopathology.* 2014 Jan;64(2):263-73.

Goretzki PE, Frilling A, Simon D, Rocher HD. Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man. *Recent Results Cancer Res.* 1990; 118:48-63.

Goretzki, PE, Frilling, A, Simon, D, Rastegar, M, & Ohmann, C. Growth regulation of human thyrocytes by thyrotropin, cyclic adenosine monophosphate, epidermal growth factor and insulin-like growth factor. In *Growth regulation of thyroid gland and thyroid tumors.* Karger Publishers 1989; 18:56-80.

Goto H, Tomono Y, Ajiro K, Kosako H, Fujita M, Sakurai M, Okawa K, Iwamatsu A, Okigaki T, Takahashi T, Inagaki M. Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem.* 1999 Sep 3;274(36):25543-9.

Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells.* 2002 Jan;7(1):11-7.

Gottlieb S, Statement from FDA Commissioner. on FDA approves first-of-its kind targeted RNA-based therapy to treat a rare disease. FDA Statement; August 10, 2018. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-its-kind-targeted-rna-based-therapy-treat-rare-disease>.

Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR; VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial

Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2004 Dec 30;351(27):2805-16.

Grallert A, Boke E, Hagting A, Hodgson B, Connolly Y, Griffiths JR, Smith DL, Pines J, Hagan IM. A PP1-PP2A phosphatase relay controls mitotic progression. *Nature*. 2015 Jan 1;517(7532):94-98.

Gramza AW, Balasubramaniam S, Fojo AT, Ward J, Wells SA. Phase I/II trial of crolibulin and cisplatin in solid tumors with a focus on anaplastic thyroid cancer: Phase I results. *JCO* 2013 05/20;31(15):6074. Available from: [https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2013.31.15\\_suppl.6074](https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2013.31.15_suppl.6074).

Graser S, Stierhof YD, Nigg EA. Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. *J Cell Sci*. 2007 Dec 15;120(Pt 24):4321-31.

Green MR, Woolery JE, Mahadevan D. Update on Aurora Kinase Targeted Therapeutics in Oncology. *Expert Opin Drug Discov*. 2011 Mar;6(3):291-307.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005 Nov 18;123(4):631-40.

Grijalvo S, Alagia A, Jorge AF, Eritja R. Covalent Strategies for Targeting Messenger and Non-Coding RNAs: An Updated Review on siRNA, miRNA and antimir Conjugates. *Genes (Basel)*. 2018 Feb 6;9(2).

Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):537-41.

Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA. Fatality in mice due to oversaturation of

cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):537-41.

Gromley A, Yeaman C, Rosa J, Redick S, Chen CT, Mirabelle S, Guha M, Sillibourne J, Doxsey SJ. Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission. *Cell*. 2005 Oct 7;123(1):75-87.

Gruss OJ, Carazo-Salas RE, Schatz CA, Guarguaglini G, Kast J, Wilm M, Le Bot N, Vernos I, Karsenti E, Mattaj JW. Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*. 2001 Jan 12;104(1):83-93.

Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010 Aug 12;466(7308):835-40.

Guo P, Coban O, Snead NM, Trebley J, Hoeprich S, Guo S, Shu Y. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 Apr 30;62(6):650-66. Review.

Gurtner A, Falcone E, Garibaldi F, Piaggio G. Dysregulation of microRNA biogenesis in cancer: the impact of mutant p53 on Drosha complex activity. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016 Mar 12;35:45.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000 Mar 16;404(6775):293-6.

Hanisch A, Wehner A, Nigg EA, Silljé HH. Different Plk1 functions show distinct dependencies on Polo-Box domain-mediated targeting. *Mol Biol Cell*. 2006 Jan;17(1):448-59.

Haren L, Stearns T, Lüders J. Plk1-dependent recruitment of gamma-tubulin complexes to mitotic centrosomes involves multiple PCM components. *PLoS One*. 2009 Jun 19;4(6): e5976.

Hari KL, Cook KR, Karpen GH. The *Drosophila* Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev.* 2001 Jun 1;15(11):1334-48.

Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, StewardDL, Tuttle RM, Wartofsky L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016 Jan;26(1):1-133.

Hay ID, Hutchinson ME, Gonzalez-Losada T, McIver B, Reinalda ME, Grant CS, Thompson GB, Sebo TJ, Goellner JR. Papillary thyroid microcarcinoma: a study of 900 cases observed in a 60-year period. *Surgery.* 2008 Dec;144(6):980-7.

He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004 Jul;5(7):522-31. Review.

He R, Wu Q, Zhou H, Huang N, Chen J, Teng J. Cep57 protein is required for cytokinesis by facilitating central spindle microtubule organization. *J Biol Chem.* 2013 May 17;288(20):14384-90.

Hégarat N, Rata S, Hochegger H. Bistability of mitotic entry and exit switches during open mitosis in mammalian cells. *Bioessays.* 2016 Jul;38(7):627-43

Heim A, Konietzny A, Mayer TU. Protein phosphatase 1 is essential for Greatwall inactivation at mitotic exit. *EMBO Rep.* 2015 Nov;16(11):1501-10.

Hendriks IA, Lyon D, Young C, Jensen LJ, Vertegaal AC, Nielsen ML. Site-specific mapping of the human SUMO proteome reveals co-modification with phosphorylation. *Nat Struct Mol Biol.* 2017 Mar;24(3):325-336.



Hendriks IA, Vertegaal AC. A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Sep;17(9):581-95. Review.

Herold S, Hock A, Herkert B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen R, Bernards R, Eilers M. Miz1 and HectH9 regulate the stability of the checkpoint protein, TopBP1. *EMBO J.* 2008 Nov 5;27(21):2851-61.

Herzog F, Primorac I, Dube P, Lenart P, Sander B, Mechtler K, Stark H, Peters JM. Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. *Science.* 2009 Mar 13;323(5920):1477-81.

Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, Clarke RB, de Jong S, Jonkers J, Mælandsmo GM, Roman-Roman S, Seoane J, Trusolino L, Villanueva A. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.* 2014 Sep;4(9):998-1013.

Hiltzik D, Carlson DL, Tuttle RM, Chuai S, Ishill N, Shaha A, Shah JP, Singh B, Ghossein RA. Poorly differentiated thyroid carcinomas defined on the basis of mitosis and necrosis: a clinicopathologic study of 58 patients. *Cancer.* 2006 Mar 15;106(6):1286-95.

Hines WC, Yaswen P, Bissell MJ. Modelling breast cancer requires identification and correction of a critical cell lineage-dependent transduction bias. *Nat Commun.* 2015 Apr 21;6:6927.

Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K, Saya H. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell.* 2003 Sep 5;114(5):585-98.

Ho AL, Grewal RK, Leboeuf R, Sherman EJ, Pfister DG, Deandreis D, Pentlow KS, Zanzonico PB, Haque S, Gavane S, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, Domínguez JM, Shen R, Tuttle RM, Larson SM, Fagin JA. Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *N Engl J Med.* 2013 Feb 14;368(7):623-32.

Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Nov;9(11):910-6. Review.

Holland AJ, Fachinetti D, Zhu Q, Bauer M, Verma IM, Nigg EA, Cleveland DW. The autoregulated instability of Polo-like kinase 4 limits centrosome duplication to once per cell cycle. *Genes Dev.* 2012 Dec 15;26(24):2684-9.

Honma K, Ochiya T, Nagahara S, Sano A, Yamamoto H, Hirai K, Aso Y, Terada M. Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Dec 21;289(5):1075-81.

Horn V, Thélou J, Garcia A, Albigès-Rizo C, Block MR, Viallet J. Functional interaction of Aurora-A and PP2A during mitosis. *Mol Biol Cell.* 2007 Apr;18(4):1233-41.

Hu CK, Ozl  N, Coughlin M, Steen JJ, Mitchison TJ. Plk1 negatively regulates PRC1 to prevent premature midzone formation before cytokinesis. *Mol Biol Cell.* 2012 Jul;23(14):2702-11.

Huertas D, Soler M, Moreto J, Villanueva A, Martinez A, Vidal A, Charlton M, Moffat D, Patel S, McDermott J, Owen J, Brotherton D, Krige D, Cuthill S, Esteller M. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of the histone kinase Haspin. *Oncogene.* 2012 Mar 15;31(11):1408-18.

Hughes SE, Beeler JS, Seat A, Slaughter BD, Unruh JR, Bauerly E, Matthies HJ, Hawley RS. Gamma-tubulin is required for bipolar spindle assembly and for proper kinetochore microtubule attachments during prometaphase I in *Drosophila* oocytes. *PLoS Genet.* 2011 Aug;7(8):e1002209.

Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer.* 1998 Dec 15;83(12):2638-48.

Husberg C, Agnetti G, Holewinski RJ, Christensen G, Van Eyk JE. Dephosphorylation of cardiac proteins in vitro - a matter of phosphatase specificity. *Proteomics*. 2012 Apr;12(7):973-8.

Hydbring P, Badalian-Very G. Clinical applications of microRNAs. Version 3. F1000Res. 2013 Jun 6 [revised 2013 Jan 1];2:136. Review.

Ibrahimasic T, Ghossein R, Carlson DL, Nixon I, Palmer FL, Shaha AR, Patel SG, Tuttle RM, Shah JP, Ganly I. Outcomes in patients with poorly differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(4):1245-52.

Ibrahimasic T, Xu B, Landa I, Dogan S, Middha S, Seshan V, Deraje S, Carlson DL, Migliacci J, Knauf JA, Untch B, Berger MF, Morris L, Tuttle RM, Chan T, Fagin JA, Ghossein R, Ganly I. Genomic Alterations in Fatal Forms of Non-Anaplastic Thyroid Cancer: Identification of MED12 and RBM10 as Novel Thyroid Cancer Genes Associated with Tumor Virulence. *Clin Cancer Res*. 2017 Oct 1;23(19):5970-5980.

Iñiguez-Ariza NM, Ryder MM, Hilger CR, Bible KC. Salvage Lenvatinib Therapy in Metastatic Anaplastic Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2017 Jul;27(7):923-927.

Inoue Y, Kiryu S, Watanabe M, Tojo A, Ohtomo K. Timing of imaging after d-luciferin injection affects the longitudinal assessment of tumor growth using in vivo bioluminescence imaging. *Int J Biomed Imaging*. 2010; 2010:471408.

Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med*. 2012;4:143–159.

Isham CR, Bossou AR, Negron V, Fisher KE, Kumar R, Marlow L, Lingle WL, Smallridge RC, Sherman EJ, Suman VJ, Copland JA, Bible KC. Pazopanib enhances paclitaxel-induced mitotic catastrophe in anaplastic thyroid cancer. *Sci Transl Med*. 2013 Jan 2;5(166):166ra3.

Ito T, Seyama T, Hayashi Y, Hayashi T, Dohi K, Mizuno T, Iwamoto K, Tsuyama N, Nakamura N, Akiyama M. Establishment of 2 human thyroid-carcinoma cell-lines (8305c, 8505c) bearing p53 gene-mutations. *Int J Oncol.* 1994 Mar;4(3):583-6.

Ito Y, Onoda N, Ito KI, Sugitani I, Takahashi S, Yamaguchi I, Kabu K, Tsukada K. Sorafenib in Japanese Patients with Locally Advanced or Metastatic Medullary Thyroid Carcinoma and Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Thyroid.* 2017 Sep;27(9):1142-1148.

Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, Johnson JM, Lim L, Karpilow J, Nichols K, Marshall W, Khvorova A, Linsley PS. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA.* 2006 Jul;12(7):1197-205.

Jacoby WG. Loess: A nonparametric, graphical tool for depicting relationships between variables. *Electoral Studies.* 2000;19(4):577-613.

Janeček M, Rossmann M, Sharma P, Emery A, Huggins DJ, Stockwell SR, Stokes JE, Tan YS, Almeida EG, Hardwick B, Narvaez AJ, Hyvönen M, Spring DR, McKenzie GJ, Venkitaraman AR. Allosteric modulation of AURKA kinase activity by a small-molecule inhibitor of its protein-protein interaction with TPX2. *Sci Rep.* 2016 Jun 24; 6:28528.

Jang HD, Yoon K, Shin YJ, Kim J, Lee SY. PIAS3 suppresses NF-kappaB-mediated transcription by interacting with the p65/RelA subunit. *J Biol Chem.* 2004 Jun 4;279(23):24873-80.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008 Mar-Apr;58(2):71-96.

Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone AM, Markowitz LE, Kohler B, Ehemann C, Saraiya M, Bandi P, Saslow D, Cronin KA, Watson M, Schiffman M, Henley SJ, Schymura MJ, Anderson RN, Yankey D, Edwards BK. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human

papillomavirus(HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *J Natl Cancer Inst.* 2013 Feb 6;105(3):175-201.

Jeyaprakash AA, Klein UR, Lindner D, Ebert J, Nigg EA, Conti E. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell.* 2007 Oct 19;131(2):271-85.

Jiang FZ, He YY, Wang HH, Zhang HL, Zhang J, Yan XF, Wang XJ, Che Q, Ke JQ, Chen Z, Tong H, Zhang YL, Wang FY, Li YR, Wan XP. Mutant p53 induces EZH2 expression and promotes epithelial-mesenchymal transition by disrupting p68-Drosha complex assembly and attenuating miR-26a processing. *Oncotarget.* 2015 Dec 29;6(42):44660-74.

Jiang L, Paone S, Caruso S, Atkin-Smith GK, Phan TK, Hulett MD, Poon IKH. Determining the contents and cell origins of apoptotic bodies by flow cytometry. *Sci Rep.* 2017 Oct 31;7(1):14444.

Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature.* 2009 Jan 22;457(7228):405-12.

Jordan A, Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:71-98. Review.

Joseph J, Liu ST, Jablonski SA, Yen TJ, Dasso M. The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo. *Curr Biol.* 2004 Apr 6;14(7):611-7.

Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther.* 2006 Mar;13(3):494-505.

Judge AD, Robbins M, Tavakoli I, Levi J, Hu L, Fronda A, Ambegia E, McClintock K, MacLachlan I. Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *J Clin Invest.* 2009 Mar;119(3):661-73.

Kagey MH, Melhuish TA, Wotton D. The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell*. 2003 Apr 4;113(1):127-37.

Kanda T, Sullivan KF, Wahl GM. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol*. 1998 Mar 26;8(7):377-85.

Karess R. Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint. *Trends Cell Biol*. 2005 Jul;15(7):386-92. Review.

Karthigeyan D, Prasad SB, Shandilya J, Agrawal S, Kundu TK. Biology of Aurora A kinase: implications in cancer manifestation and therapy. *Med Res Rev*. 2011 Sep;31(5):757-93.

Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, Woeber KA, McMillan A. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer*. 2005 Apr 1;103(7):1330-5.

Kelly LM, Barila G, Liu P, Evdokimova VN, Trivedi S, Panebianco F, Gandhi M, Carty SE, Hodak SP, Luo J, Dacic S, Yu YP, Nikiforova MN, Ferris RL, Altschuler DL, Nikiforov YE. Identification of the transforming STRN-ALK fusion as a potential therapeutic target in the aggressive forms of thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 18;111(11):4233-8.

Kim SH, Jeong JH, Lee SH, Kim SW, Park TG. LHRH receptor-mediated delivery of siRNA using polyelectrolyte complex micelles self-assembled from siRNA-PEG-LHRH conjugate and PEI. *Bioconjug Chem*. 2008 Nov 19;19(11):2156-62.

Kitagawa M, Fung SY, Onishi N, Saya H, Lee SH. Targeting Aurora B to the equatorial cortex by MKlp2 is required for cytokinesis. *PLoS One*. 2013 Jun 4;8(6):e64826.

Kiyomitsu T, Murakami H, Yanagida M. Protein interaction domain mapping of human kinetochore protein Blinkin reveals a consensus motif for binding of spindle assembly checkpoint proteins Bub1 and BubR1. *Mol Cell Biol*. 2011 Mar;31(5):998-1011.

Kok KH, Ng MH, Ching YP, Jin DY. Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *J Biol Chem*. 2007 Jun 15;282(24):17649-57.

Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Jan 20;11(2):125-40.

Kollipara R, Schneider B, Radovich M, Babu S, Kiel PJ. Exceptional Response with Immunotherapy in a Patient with Anaplastic Thyroid Cancer. *Oncologist*. 2017 Oct;22(10):1149-1151.

Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):292-306. Review.

Kong D, Farmer V, Shukla A, James J, Gruskin R, Kiriya S, Loncarek J. Centriole maturation requires regulated Plk1 activity during two consecutive cell cycles. *J Cell Biol*. 2014 Sep 29;206(7):855-65.

Kong SH, Ryu J, Kim MJ, Cho SW, Song YS, Yi KH, Park DJ, Hwangbo Y, Lee YJ, Lee KE, Kim SJ, Jeong WJ, Chung EJ, Hah JH, Choi JY, Ryu CH, Jung YS, Moon JH, Lee EK, Park YJ. Longitudinal Assessment of Quality of Life According to Treatment Options in Low-Risk Papillary Thyroid Microcarcinoma Patients: Active Surveillance or Immediate Surgery (Interim Analysis of MAeSTro). *Thyroid*. 2019 Aug;29(8):1089-1096.

Kong X, Ma S, Guo J, Ma Y, Hu Y, Wang J, Zheng Y. Ubiquitously expressed transcript is a novel interacting protein of protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 2. *Mol Med Rep*. 2015 Apr;11(4):2443-8.

Kotaja N, Aittomäki S, Silvennoinen O, Palvimo JJ, Jänne OA. ARIP3 (androgen receptor-interacting protein 3) and other PIAS (protein



inhibitor of activated STAT) proteins differ in their ability to modulate steroid receptor-dependent transcriptional activation. *Mol Endocrinol*. 2000 Dec;14(12):1986-2000.

Kotaja N, Karvonen U, Jänne OA, Palvimo JJ. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol*. 2002b Jul;22(14):5222-34.

Kotaja N, Vihinen M, Palvimo JJ, Jänne OA. Androgen receptor-interacting protein 3 and other PIAS proteins cooperate with glucocorticoid receptor-interacting protein 1 in steroid receptor-dependent signaling. *J Biol Chem*. 2002a May 17;277(20):17781-8.

Kovacsics D, Raper J. Transient expression of proteins by hydrodynamic gene delivery in mice. *J Vis Exp*. 2014 May 5;(87).

Koyama S, Miyake N, Fujiwara K, Morisaki T, Fukuhara T, Kitano H, Takeuchi H. Lenvatinib for Anaplastic Thyroid Cancer and Lenvatinib-Induced Thyroid Dysfunction. *Eur Thyroid J*. 2018 Jun;7(3):139-144.

Kuhn E, Ayhan A, Bahadirli-Talbott A, Zhao C, Shih IeM. Molecular characterization of undifferentiated carcinoma associated with endometrioid carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2014 May;38(5):660-5.

Kweon SS. Updates on Cancer Epidemiology in Korea, 2018. *Chonnam Med J*. 2018 May;54(2):90-100. Review.

Kwon J, Kim BH, Jung HW, Besic N, Sugitani I, Wu HG. The prognostic impacts of postoperative radiotherapy in the patients with resected anaplastic thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2016 May; 59:34-45.

Lam J, Worsley A. What is the future of siRNA therapeutics? *Journal of Drug Design and Research*. 2014;1(1):1005.

Landa I, Ibrahimasic T, Boucai L, Sinha R, Knauf JA, Shah RH, Dogan S, Ricarte-Filho JC, Krishnamoorthy GP, Xu B, Schultz N, Berger MF, Sander C, Taylor BS, Ghossein R, Ganly I, Fagin JA.

Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest*. 2016 Mar 1;126(3):1052-66.

Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol*. 2012 Nov 20;22(22): R966-80.

Ledford H. Gene-silencing technology gets first drug approval after 20-year wait. *Nature*. 2018 Aug;560(7718):291-292.

Lee K, Rhee K. PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis. *J Cell Biol*. 2011 Dec 26;195(7):1093-101.

Lee MB, Lebedeva LA, Suzawa M, Wadekar SA, Desclozeaux M, Ingraham HA. The DEAD-box protein DP103 (Ddx20 or Gemin-3) represses orphan nuclear receptor activity via SUMO modification. *Mol Cell Biol*. 2005 Mar;25(5):1879-90.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415-9.

Lemoine NR, Mayall ES, Jones T, Sheer D, McDermid S, Kendall-Taylor P, Wynford-Thomas D. Characterisation of human thyroid epithelial cells immortalised in vitro by simian virus 40 DNA transfection. *Br J Cancer*. 1989 Dec;60(6):897-903.

LeNoue-Newton M, Watkins GR, Zou P, Germane KL, McCorvey LR, Wadzinski BE, Spiller BW. The E3 ubiquitin ligase- and protein phosphatase 2A (PP2A)-binding domains of the Alpha4 protein are both required for Alpha4 to inhibit PP2A degradation. *J Biol Chem*. 2011 May 20;286(20):17665-71.

Lens SM, Voest EE, Medema RH. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010 Dec;10(12):825-41. Review.

Levin AA. Treating Disease at the RNA Level with Oligonucleotides. *N Engl J Med*. 2019 Jan 3;380(1):57-70.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005 Jan 14;120(1):15-20.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003 Dec 26;115(7):787-98.

Lewis DL, Wolff JA. Delivery of siRNA and siRNA expression constructs to adult mammals by hydrodynamic intravascular injection. *Methods Enzymol*. 2005;392:336-50.

Li X, Wang D, Zhao Q, Ren D, Ren F, Chen G, Liu H, Chen J. Clinical Significance and Next-Generation Sequencing of Chinese Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma. *Sci Rep*. 2017;7(1):3947.

Liang YC, Lee CC, Yao YL, Lai CC, Schmitz ML, Yang WM. SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. *Sci Rep*. 2016 May 23; 6:26509.

Liao J, Fu Y, Shuai K. Distinct roles of the NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 9;97(10):5267-72.

Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jun;15(6):321-33. Review.

Lindon C, Pines J. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J Cell Biol*. 2004 Jan 19;164(2):233-41.

Lindqvist A, Rodríguez-Bravo V, Medema RH. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol.* 2009 Apr 20;185(2):193-202.

Ling Y, Sankpal UT, Robertson AK, McNally JG, Karpova T, Robertson KD. Modification of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by SUMO-1 modulates its interaction with histone deacetylases (HDACs) and its capacity to repress transcription. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 29;32(2):598-610.

Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 1;95(18):10626-31.

Liu B, Tahk S, Yee KM, Fan G, Shuai K. The ligase PIAS1 restricts natural regulatory T cell differentiation by epigenetic repression. *Science.* 2010 Oct 22;330(6003):521-5.

Liu B, Yang R, Wong KA, Getman C, Stein N, Teitell MA, Cheng G, Wu H, Shuai K. Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1. *Mol Cell Biol.* 2005 Feb;25(3):1113-23.

Liu B, Yee KM, Tahk S, Mackie R, Hsu C, Shuai K. PIAS1 SUMO ligase regulates the self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells. *EMBO J.* 2014 Jan 13;33(2):101-13.

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 2004 Sep 3;305(5689):1437-41.

Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol.* 2005 Jul;7(7):719-23.

Liu J, Yao F, Wu R, Morgan M, Thorburn A, Finley RL Jr, Chen YQ. Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha. *J Biol Chem.* 2002 Jul 19;277(29):26281-5.

Liu L, Li D, Chen Z, Yang J, Ma Y, Cai H, Shan C, Lv Z, Zhang X. Wild-Type P53 Induces Sodium/Iodide Symporter Expression Allowing Radioiodide Therapy in Anaplastic Thyroid Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(3):905-914.

Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2016 Mar;23(3):R143-55. Review.

Liu ST, Wang WH, Hong YR, Chuang JY, Lu PJ, Chang LK. Sumoylation of Rta of Epstein-Barr virus is preferentially enhanced by PIASxbeta. *Virus Res*. 2006 Aug;119(2):163-70.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Livhits MJ, Yeh MW. Multimodality treatment with surgery, external-beam radiation, and chemotherapy improves survival for selected patients with anaplastic thyroid cancer. *Clinical Thyroidology* 2017 Mar; 29: 90-93.

Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, Rosai, editors. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2017.

Logarinho E, Resende T, Torres C, Bousbaa H. The human spindle assembly checkpoint protein Bub3 is required for the establishment of efficient kinetochore-microtubule attachments. *Mol Biol Cell*. 2008 Apr;19(4):1798-813.

Lossos IS, Czerwinski DK, Wechser MA, Levy R. Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia*. 2003 Apr;17(4):789-95.

Lüders J, Patel UK, Stearns T. GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nat Cell Biol*. 2006 Feb;8(2):137-47.

Lüders J, Stearns T. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Feb;8(2):161-7. Review.

Lukinavičius G, Blaukopf C, Pershagen E, Schena A, Reymond L, Derivery E, Gonzalez-Gaitan M, D'Este E, Hell SW, Wolfram Gerlich D, Johnsson K. SiR-Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy. *Nat Commun.* 2015 Oct 1; 6:8497.

Lundin KE, Højland T, Hansen BR, Persson R, Bramsen JB, Kjems J, Koch T, Wengel J, Smith CI. Biological activity and biotechnological aspects of locked nucleic acids. *Adv Genet.* 2013; 82:47-107. Review.

Luo Y, Na Z, Slavoff SA. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry.* 2018 May 1;57(17):2424-2431.

Luster M, Aktolun C, Amendoeira I, Barczyński M, Bible KC, Duntas LH, Elisei R, Handkiewicz-Junak D, Hoffmann M, Jarzab B, Leenhardt L, Musholt TJ, Newbold K, Nixon IJ, Smit J, Sobrinho-Simões M, Sosa JA, Tuttle RM, Verburg FA, Wartofsky L, Führer D. European Perspective on 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: Proceedings of an Interactive International Symposium. *Thyroid.* 2019;29(1):7-26.

Ma HT, Poon RY. Synchronization of HeLa Cells. *Methods Mol Biol.* 2017;1524:189-201.

Ma S, Vigneron S, Robert P, Strub JM, Cianferani S, Castro A, Lorca T. Greatwall dephosphorylation and inactivation upon mitotic exit is triggered by PP1. *J Cell Sci.* 2016 Apr 1;129(7):1329-39.

Malinen M, Niskanen EA, Kaikkonen MU, Palvimo JJ. Crosstalk between androgen and pro-inflammatory signaling remodels androgen receptor and NF- $\kappa$ B cisome to reprogram the prostate cancer cell transcriptome. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 25;45(2):619-630.

Mallampati S, Sun B, Lu Y, Ma H, Gong Y, Wang D, Lee JS, Lin K, Sun X. Integrated genetic approaches identify the molecular

mechanisms of Sox4 in early B-cell development: intricate roles for RAG1/2 and CK1 $\epsilon$ . *Blood*. 2014 Jun 26;123(26):4064-76.

Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Aug;86(16):6077-81.

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009 Mar;9(3):153-66.

Mardin BR, Agircan FG, Lange C, Schiebel E. Plk1 controls the Nek2A-PP1 $\gamma$  antagonism in centrosome disjunction. *Curr Biol*. 2011 Jul 12;21(13):1145-51.

Mardin BR, Lange C, Baxter JE, Hardy T, Scholz SR, Fry AM, Schiebel E. Components of the Hippo pathway cooperate with Nek2 kinase to regulate centrosome disjunction. *Nat Cell Biol*. 2010 Dec;12(12):1166-76.

Maric I, Viaggi S, Caria P, Frau DV, Degan P, Vanni R. Centrosomal and mitotic abnormalities in cell lines derived from papillary thyroid cancer harbouring specific gene alterations. *Mol Cytogenet*. 2011 Nov 16;4:26.

Martincorena I, Raine KM, Gerstung M, Dawson KJ, Haase K, Van Loo P, Davies H, Stratton MR, Campbell PJ. Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues. *Cell*. 2018 Jun 14;173(7):1823.

Matsuda S, Keiser K, Nair JK, Charisse K, Manoharan RM, Kretschmer P, Peng CG, V Kel'in A, Kandasamy P, Willoughby JL, Liebow A, Querbes W, Yucius K, Nguyen T, Milstein S, Maier MA, Rajeev KG, Manoharan M. siRNA conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-acetylgalactosamine linked through nucleosides elicit robust gene silencing in vivo in hepatocytes. *ACS Chem Biol*. 2015 May 15;10(5):1181-7.

Matsui M, Corey DR. Non-coding RNAs as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Mar;16(3):167-179.



Máximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M. Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hürthle cell tumors. *Am J Pathol*. 2002 May;160(5):1857-65.

McAinsh AD, Meraldi P. The CCAN complex: linking centromere specification to control of kinetochore-microtubule dynamics. *Semin Cell Dev Biol*. 2011 Dec;22(9):946-52.

McClelland ML, Gardner RD, Kallio MJ, Daum JR, Gorbsky GJ, Burke DJ, Stukenberg PT. The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity. *Genes Dev*. 2003 Jan1;17(1):101-14.

McCloy RA, Parker BL, Rogers S, Chaudhuri R, Gayevskiy V, Hoffman NJ, Ali N, Watkins DN, Daly RJ, James DE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Global Phosphoproteomic Mapping of Early Mitotic Exit in Human Cells Identifies Novel Substrate Dephosphorylation Motifs. *Mol Cell Proteomics*. 2015 Aug;14(8):2194-212.

McCullough J, Colf LA, Sundquist WI. Membrane fission reactions of the mammalian ESCRT pathway. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:663-92. Review.

McNamara JO 2nd, Andrechek ER, Wang Y, Viles KD, Rempel RE, Gilboa E, Sullenger BA, Giangrande PH. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol*. 2006 Aug;24(8):1005-15.

Meerang M, Ritz D, Paliwal S, Garajova Z, Bosshard M, Mailand N, Janscak P, Hübscher U, Meyer H, Ramadan K. The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol*. 2011 Oct 23;13(11):1376-82.

Mehlen P, Tauszig-Delamasure S. Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut*. 2014 Nov;63(11):1821-9.

Mehta A, Zhang L, Boufraqueh M, Liu-Chittenden Y, Zhang Y, Patel D, Davis S, Rosenberg A, Ylaya K, Aufforth R, Li Z, Shen M, Kebebew E. Inhibition of Survivin with YM155 Induces Durable Tumor Response in Anaplastic Thyroid Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015b Sep 15;21(18):4123-32.

Mehta A, Zhang L, Boufraqueh M, Zhang Y, Patel D, Shen M, Kebebew E. Carfilzomib is an effective anticancer agent in anaplastic thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2015a Jun;22(3):319-29.

Mei K, Guo W. The exocyst complex. *Curr Biol*. 2018 Sep 10;28(17):R922-R925.

Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):343-9. Review.

Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet*. 2013 Jul;14(7):447-59. Review.

Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Batista R, Peixoto J, Tavares C, Celestino R, Almeida A, Salgado C, Eloy C, Castro P, Prazeres H, Lima J, Amaro T, Lobo C, Martins MJ, Moura M, Cavaco B, Leite V, Cameselle-Teijeiro JM, Carrilho F, Carneiro M, Máximo V, Sobrinho-Simões M, Soares P. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 May;99(5):E754-65.

Merkel OM, Librizzi D, Pfestroff A, Schurrat T, Buyens K, Sanders NN, De Smedt SC, Béhé M, Kissel T. Stability of siRNA polyplexes from poly(ethylenimine) and poly(ethylenimine)-g-poly(ethylene glycol) under in vivo conditions: effects on pharmacokinetics and biodistribution measured by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy and Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) imaging. *J Control Release*. 2009 Sep 1;138(2):148-59.

Mills CA, Suzuki A, Arceci A, Mo JY, Duncan A, Salmon ED, Emanuele MJ. Nucleolar and spindle-associated protein 1 (NUSAP1)

interacts with a SUMO E3 ligase complex during chromosome segregation. *J Biol Chem*. 2017 Oct 20;292(42):17178-17189.

Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M, Honma K, Nagahara S, Hanai K, Sano A, Kato T, Terada M, Ochiya T. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 22;32(13):e109.

Minty A, Dumont X, Kaghad M, Caput D. Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem*. 2000 Nov 17;275(46):36316-23.

Mio C, Lavarone E, Conzatti K, Baldan F, Toffoletto B, Puppin C, Filetti S, Durante C, Russo D, Orlacchio A, Di Cristofano A, Di Loreto C, Damante G. MCM5 as a target of BET inhibitors in thyroid cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2016 Apr;23(4):335-47.

Mitchell AL, Gandhi A, Scott-Coombes D, Perros P. Management of thyroid cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol*. 2016 May;130(S2):S150-S160.

Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2002 May;20(5):497-500.

Miyauchi Y, Yogosawa S, Honda R, Nishida T, Yasuda H. Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes. *J Biol Chem*. 2002 Dec 20;277(51):50131-6.

Mochida S, Maslen SL, Skehel M, Hunt T. Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science*. 2010 Dec 17;330(6011):1670-3.

Mohr SE, Boswell RE. Zimp encodes a homologue of mouse Miz1 and PIAS3 and is an essential gene in *Drosophila melanogaster*. *Gene*. 1999 Mar 18;229(1-2):109-16.

Moilanen AM, Karvonen U, Poukka H, Yan W, Toppari J, Jänne OA, Palvimo JJ. A testis-specific androgen receptor coregulator that belongs to a novel family of nuclear proteins. *J Biol Chem*. 1999 Feb 5;274(6):3700-4.

Molinaro E, Romei C, Biagini A, Sabini E, Agate L, Mazzeo S, Materazzi G, Sellari-Franceschini S, Ribechini A, Torregrossa L, Basolo F, Vitti P, Elisei R. Anaplastic thyroid carcinoma: from clinicopathology to genetics and advanced therapies. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Nov;13(11):644-660.

Moreno PM, Pêgo AP. Therapeutic antisense oligonucleotides against cancer: hurdling to the clinic. *Front Chem*. 2014 Oct 14; 2:87.

Morgan, DO. The cell cycle: principles of control. Oxford, London: NSP, New Science Press; 2007. 297 p.

Morris JR, Boutell C, Keppler M, Densham R, Weekes D, Alamshah A, Butler L, Galanty Y, Panton L, Kiuchi T, Ng T, Solomon E. The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature*. 2009 Dec 17;462(7275):886-90.

Müller H, Schmidt D, Steinbrink S, Mirgorodskaya E, Lehmann V, Habermann K, Dreher F, Gustavsson N, Kessler T, Lehrach H, Herwig R, Gobom J, Ploubidou A, Boutros M, Lange BM. Proteomic and functional analysis of the mitotic *Drosophila* centrosome. *EMBO J*. 2010 Oct 6;29(19):3344-57.

Murray AW. A brief history of error. *Nat Cell Biol*. 2011 Oct 3;13(10):1178-82.

Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 May;8(5):379-93. Review.

Nacerddine K, Lehenbre F, Bhaumik M, Artus J, Cohen-Tannoudji M, Babinet C, Pandolfi PP, Dejean A. The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell*. 2005 Dec;9(6):769-79.

Nagaiah G, Hossain A, Mooney CJ, Parmentier J, Remick SC. Anaplastic thyroid cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Oncol*. 2011; 2011:542358.

Nair JK, Willoughby JL, Chan A, Charisse K, Alam MR, Wang Q, Hoekstra M, Kandasamy P, Kel'in AV, Milstein S, Taneja N, O'Shea J, Shaikh S, Zhang L, van der Sluis RJ, Jung ME, Akinc A, Hutabarat R, Kuchimanchi S, Fitzgerald K, Zimmermann T, van Berkel TJ, Maier MA, Rajeev KG, Manoharan M. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc*. 2014 Dec 10;136(49):16958-61.

Naughton BJ, Han DD, Gu HH. Fluorescence-based evaluation of shRNA efficacy. *Anal Biochem*. 2011 Oct 1;417(1):162-4.

Nayak TR, Krasteva LK, Cai W. Multimodality imaging of RNA interference. *Curr Med Chem*. 2013;20(29):3664-75. Review.

Neef R, Gruneberg U, Kopajtich R, Li X, Nigg EA, Sillje H, Barr FA. Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nat Cell Biol*. 2007 Apr;9(4):436-44.

Niewerth D, Jansen G, Assaraf YG, Zweegman S, Kaspers GJ, Cloos J. Molecular basis of resistance to proteasome inhibitors in hematological malignancies. *Drug Resist Updat*. 2015 Jan; 18:18-35.

Nigg EA, Stearns T. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol*. 2011 Oct 3;13(10):1154-60.

Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson LD, editors. Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid. 2nd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.

Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LD, Barletta JA, Wenig BM, Al Ghuzlan A, Kakudo K,

Giordano TJ, Alves VA, Khanafshar E, Asa SL, El-Naggar AK, Gooding WE, Hodak SP, Lloyd RV, Maytal G, Mete O, Nikiforova MN, Nosé V, Papotti M, Poller DN, Sadow PM, Tischler AS, Tuttle RM, Wall KB, LiVolsi VA, Randolph GW, Ghossein RA. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors. *JAMA Oncol.* 2016 Aug 1;2(8):1023-9.

Nikiforova MN, Nikitski AV, Panebianco F, Kaya C, Yip L, Williams M, Chiosea SI, Seethala RR, Roy S, Condello V, Santana-Santos L, Wald AI, Carty SE, Ferris RL, El-Naggar AK, Nikiforov YE. GLIS Rearrangement is a Genomic Hallmark of Hyalinizing Trabecular Tumor of the Thyroid Gland. *Thyroid.* 2019 Feb;29(2):161-173.

Nilsson J. Looping in on Ndc80 - how does a protein loop at the kinetochore control chromosome segregation? *Bioessays.* 2012 Dec;34(12):1070-7.

Nishida T, Yasuda H. PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem.* 2002 Nov 1;277(44):41311-7.

Nixon IJ, Whitcher MM, Palmer FL, Tuttle RM, Shaha AR, Shah JP, Patel SG, Ganly I. The impact of distant metastases at presentation on prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid.* 2012 Sep;22(9):884-9.

Noguchi P. Risks and benefits of gene therapy. *N Engl J Med.* 2003 Jan 16;348(3):193-4.

Nonaka D, Tang Y, Chiriboga L, Rivera M, Ghossein R. Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms. *Mod Pathol.* 2008 Feb;21(2):192-200.

Nonaka D. A study of FoxA1 expression in thyroid tumors. *Hum Pathol.* 2017 Jul;65:217-224.

Novak B, Tyson JJ, Gyorffy B, Csikasz-Nagy A. Irreversible cell-cycle transitions are due to systems-level feedback. *Nat Cell Biol.* 2007 Jul;9(7):724-8.

Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell.* 2000 Jan7;100(1):71-8. Review.

Ochiya T, Nagahara S, Sano A, Itoh H, Terada M. Biomaterials for gene delivery: atelocollagen-mediated controlled release of molecular medicines. *Curr Gene Ther.* 2001 May;1(1):31-52. Review.

Ochiya T, Takahama Y, Nagahara S, Sumita Y, Hisada A, Itoh H, Nagai Y, Terada M. New delivery system for plasmid DNA in vivo using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet. *Nat Med.* 1999 Jun;5(6):707-10.

Oda H, Miyauchi A, Ito Y, Yoshioka K, Nakayama A, Sasai H, Masuoka H, Yabuta T, Fukushima M, Higashiyama T, Kihara M, Kobayashi K, Miya A. Incidences of Unfavorable Events in the Management of Low-Risk Papillary Microcarcinoma of the Thyroid by Active Surveillance Versus Immediate Surgery. *Thyroid.* 2016 Jan;26(1):150-5.

Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Aug 10;61(10):850-62. Review.

Ohshima T, Koga H, Shimotohno K. Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem.* 2004 Jul 9;279(28):29551-7.

Okamura K, Balla S, Martin R, Liu N, Lai EC. Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. *Nat Struct Mol Biol.* 2008 Jun;15(6):581-90.

Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, Gnäd F, Cox J, Jensen TS, Nigg EA, Brunak S, Mann M. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full



phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal*. 2010 Jan 12;3(104):ra3.

O'Neill CJ, Vaughan L, Learoyd DL, Sidhu SB, Delbridge LW, Sywak MS. Management of follicular thyroid carcinoma should be individualised based on degree of capsular and vascular invasion. *Eur J Surg Oncol*. 2011 Feb;37(2):181-5.

Owen DH, Konda B, Sipos J, Liu T, Webb A, Ringel MD, Timmers CD, Shah MH. KRAS G12V Mutation in Acquired Resistance to Combined BRAF and MEK Inhibition in Papillary Thyroid Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019 May 1;17(5):409-413.

Ozkan E, Soydal C, Nak D, Kucuk NO, Kir KM. Dynamic risk stratification for predicting the recurrence in differentiated thyroid cancer. *Nucl Med Commun*. 2017 Dec;38(12):1055-1059.

Pályi I, Péter I, Daubner D, Vincze B, Ljri ncz I. Establishment, characterization and drug sensitivity of a new anaplastic thyroid carcinoma cell line (BHT-101). *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1993;63(4):263-9.

Parker R, Sheth U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*. 2007 Mar 9;25(5):635-46. Review.

Pasder O, Shpungin S, Salem Y, Makovsky A, Vilchick S, Michaeli S, Malovani H, Nir U. Downregulation of Fer induces PP1 activation and cell-cycle arrest in malignant cells. *Oncogene*. 2006 Jul 13;25(30):4194-206.

Paulin C, Fabien N, Fusco A, Pages MP, Patricot MC, Bornet H, Dubois PM. [Description of cell line established from human thyroid papillary cancer and secreting human chorionic gonadotropin hormone]. *C R Acad Sci III*. 1992;315(12):493-8.

Peer D, Park EJ, Morishita Y, Carman CV, Shimaoka M. Systemic leukocyte-directed siRNA delivery revealing cyclin D1 as an anti-inflammatory target. *Science*. 2008 Feb 1;319(5863):627-30.

Pelisch F, Sonnevile R, Pourkarimi E, Agostinho A, Blow JJ, Gartner A, Hay RT. Dynamic SUMO modification regulates mitotic chromosome assembly and cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun*. 2014 Dec 5; 5:5485.

Perdomo J, Verger A, Turner J, Crossley M. Role for SUMO modification in facilitating transcriptional repression by BKLf. *Mol Cell Biol*. 2005 Feb;25(4):1549-59.

Pérez de Castro I, Aguirre-Portolés C, Martín B, Fernández-Miranda G, Klotzbucher A, Kubbutat MH, Megías D, Arlot-Bonnemains Y, Malumbres M. A SUMOylation Motif in Aurora-A: Implications for Spindle Dynamics and Oncogenesis. *Front Oncol*. 2011 Dec 14; 1:50.

Perrier ND, Brierley JD, Tuttle RM. Differentiated and anaplastic thyroid carcinoma: Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jan;68(1):55-63. Review.

Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Sep;7(9):644-56. Review.

Petronczki M, Lénárt P, Peters JM. Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev Cell*. 2008 May;14(5):646-59.

Peukert K, Staller P, Schneider A, Carmichael G, Hänel F, Eilers M. An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J*. 1997 Sep 15;16(18):5672-86.

Pichler A, Gast A, Seeler JS, Dejean A, Melchior F. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell*. 2002 Jan 11;108(1):109-20.

Pines J. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jun 2;12(7):427-38. Review.

Poursadegh Zonouzi AA, Shekari M, Nejatizadeh A, Shakerizadeh S, Fardmanesh H, Poursadegh Zonouzi A, Rahmati-Yamchi M, Tozihi M. Impaired expression of Drosha in breast cancer. *Breast Dis.* 2017;37(2):55-62.

Pozdeyev N, Gay LM, Sokol ES, Hartmaier R, Deaver KE, Davis S, French JD, Borre PV, LaBarbera DV, Tan AC, Schweppe RE, Fishbein L, Ross JS, Haugen BR, Bowles DW. Genetic Analysis of 779 Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancers. *Clin Cancer Res.* 2018 Jul 1;24(13):3059-3068.

Preall JB, Sontheimer EJ. RNAi: RISC gets loaded. *Cell.* 2005 Nov 18;123(4):543-5.

Preto A, Cameselle-Teijeiro J, Moldes-Boullosa J, Soares P, Cameselle-Teijeiro JF, Silva P, Reis-Filho JS, Reyes-Santías RM, Alfonsín-Barreiro N, Forteza J, Sobrinho-Simões M. Telomerase expression and proliferative activity suggest a stem cell role for thyroid solid cell nests. *Mod Pathol.* 2004 Jul;17(7):819-26.

Pyndiah S, Tanida S, Ahmed KM, Cassimere EK, Choe C, Sakamuro D. c-MYC suppresses BIN1 to release poly(ADP-ribose) polymerase 1: a mechanism by which cancer cells acquire cisplatin resistance. *Sci Signal.* 2011 Mar 29;4(166):ra19.

Qian J, Beullens M, Lesage B, Bollen M. Aurora B defines its own chromosomal by opposing the recruitment of the phosphatase scaffold Repo-Man. *Curr Biol.* 2013 Jun 17;23(12):1136-43.

Rabellino A, Andreani C, Scaglioni PP. The Role of PIAS SUMO E3-Ligases in Cancer. *Cancer Res.* 2017 Apr 1;77(7):1542-1547.

Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jan 23;313(4):856-62.

Rajeev KG, Nair JK, Jayaraman M, Charisse K, Taneja N, O'Shea J, Willoughby JL, Yucius K, Nguyen T, Shulga-Morskaya S, Milstein S,

Liebow A, Querbes W, Borodovsky A, Fitzgerald K, Maier MA, Manoharan M. Hepatocyte-specific delivery of siRNAs conjugated to novel non-nucleosidic trivalent N-acetylgalactosamine elicits robust gene silencing in vivo. *Chembiochem*. 2015 Apr 13;16(6):903-8.

Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009 Jul 25;61(9):746-59.

Ravch T, Droguett G, Horwitz MS, DePinho RA, Kimchi A. DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol*. 2001 Jan;3(1):1-7.

Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, Janakiraman M, Solit D, Knauf JA, Tuttle RM, Ghossein RA, Fagin JA. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res*. 2009 Jun 1;69(11):4885-93.

Rieder CL. Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Res*. 2011 Apr;19(3):291-306.

Ritz D, Vuk M, Kirchner P, Bug M, Schütz S, Hayer A, Bremer S, Lusk C, Baloh RH, Lee H, Glatter T, Gstaiger M, Aebersold R, Weihl CC, Meyer H. Endolysosomal sorting of ubiquitylated caveolin-1 is regulated by VCP and UBXD1 and impaired by VCP disease mutations. *Nat Cell Biol*. 2011 Aug 7;13(9):1116-23.

Rivera M, Ghossein RA, Schoder H, Gomez D, Larson SM, Tuttle RM. Histopathologic characterization of radioactive iodine-refractory fluorodeoxyglucose-positron emission tomography-positive thyroid carcinoma. *Cancer*. 2008 Jul 1;113(1):48-56.

Rodrigue A, Coulombe Y, Jacquet K, Gagné JP, Roques C, Gobeil S, Poirier G, Masson JY. The RAD51 paralogs ensure cellular protection

against mitotic defects and aneuploidy. *J Cell Sci.* 2013 Jan 1;126(Pt 1):348-59.

Rogers RS, Horvath CM, Matunis MJ. SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):30091-7.

Rosas-Acosta G, Langereis MA, Deyrieux A, Wilson VG. Proteins of the PIAS family enhance the sumoylation of the papillomavirus E1 protein. *Virology.* 2005 Jan 5;331(1):190-203.

Roth W, Sustmann C, Kieslinger M, Gilmozzi A, Irmer D, Kremmer E, Turck C, Grosschedl R. PIASy-deficient mice display modest defects in IFN and Wnt signaling. *J Immunol.* 2004 Nov 15;173(10):6189-99.

Rott R, Szargel R, Shani V, Hamza H, Savyon M, Abd Elghani F, Bandopadhyay R, Engelender S. SUMOylation and ubiquitination reciprocally regulate  $\alpha$ -synuclein degradation and pathological aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Dec 12;114(50):13176-13181.

Roy A, Veroli MV, Prasad S, Wang QJ. Protein Kinase D2 Modulates Cell Cycle By Stabilizing Aurora A Kinase at Centrosomes. *Mol Cancer Res.* 2018 Nov;16(11):1785-1797.

Rozema DB, Lewis DL, Wakefield DH, Wong SC, Klein JJ, Roesch PL, Bertin SL, Reppen TW, Chu Q, Blokhin AV, Hagstrom JE, Wolff JA. Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Aug 7;104(32):12982-7.

Rui HL, Fan E, Zhou HM, Xu Z, Zhang Y, Lin SC. SUMO-1 modification of the C-terminal KVEKVD of Axin is required for JNK activation but has no effect on Wnt signaling. *J Biol Chem.* 2002 Nov 8;277(45):42981-6.

Rundle NT, Nelson J, Flory MR, Joseph J, Th'ng J, Aebersold R, Dasso M, Andersen RJ, Roberge M. An ent-kaurene that inhibits mitotic

chromosome movement and binds the kinetochore protein ran-binding protein 2. *ACS Chem Biol*. 2006 Aug 22;1(7):443-50.

Rytinki MM, Kaikkonen S, Pehkonen P, Jääskeläinen T, Palvimo JJ. PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Sep;66(18):3029-41.

Ryu H, Azuma Y. Rod/Zw10 complex is required for PIASy-dependent centromeric SUMOylation. *J Biol Chem*. 2010 Oct 15;285(42):32576-85.

Sacristan C, Kops GJ. Joined at the hip: kinetochores, microtubules, and spindle assembly checkpoint signaling. *Trends Cell Biol*. 2015 Jan;25(1):21-8.

Saini S, Tulla K, Maker AV, Burman KD, Prabhakar BS. Therapeutic advances in anaplastic thyroid cancer: a current perspective. *Mol Cancer*. 2018;17(1):154.

Saito M, Novak U, Piovan E, Basso K, Sumazin P, Schneider C, Crespo M, Shen Q, Bhagat G, Califano A, Chadburn A, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 7;106(27):11294-9.

Salehian B, Liem SY, Mojazi Amiri H, Maghami E. Clinical Trials in Management of Anaplastic Thyroid Carcinoma; Progressions and Set Backs: A Systematic Review. *Int J Endocrinol Metab*. 2019;17(1):e67759. Review.

Salguero-Aranda C, Sancho-Mensat D, Canals-Lorente B, Sultan S, Reginald A, Chapman L. STAT6 knockdown using multiple siRNA sequences inhibits proliferation and induces apoptosis of human colorectal and breast cancer cell lines. *PLoS One*. 2019 May 10;14(5):e0207558.

Salina D, Enarson P, Rattner JB, Burke B. Nup358 integrates nuclear envelope breakdown with kinetochore assembly. *J Cell Biol.* 2003 Sep 15;162(6):991-1001.

Saltman B, Singh B, Hedvat CV, Wreesmann VB, Ghossein R. Patterns of expression of cell cycle/apoptosis genes along the spectrum of thyroid carcinoma progression. *Surgery.* 2006 Dec;140(6):899-905.

Santamaria A, Wang B, Elowe S, Malik R, Zhang F, Bauer M, Schmidt A, Silljé HH, Körner R, Nigg EA. The Plk1-dependent phosphoproteome of the early mitotic spindle. *Mol Cell Proteomics.* 2011 Jan;10(1):M110.004457.

Santti H, Mikkonen L, Anand A, Hirvonen-Santti S, Toppari J, Panhuysen M, Vauti F, Perera M, Corte G, Wurst W, Jänne OA, Palvimo JJ. Disruption of the murine PIASx gene results in reduced testis weight. *J Mol Endocrinol.* 2005 Jun;34(3):645-54.

Santti H, Mikkonen L, Hirvonen-Santti S, Toppari J, Jänne OA, Palvimo JJ. Identification of a short PIASx gene promoter that directs male germ cell-specific transcription in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Aug 15;308(1):139-47.

Sardh E, Harper P, Balwani M, Stein P, Rees D, Bissell DM, Desnick R, Parker C, Phillips J, Bonkovsky HL, Vassiliou D, Penz C, Chan-Daniels A, He Q, Querbes W, Fitzgerald K, Kim JB, Garg P, Vaishnav A, Simon AR, Anderson KE. Phase 1 Trial of an RNA Interference Therapy for Acute Intermittent Porphyria. *N Engl J Med.* 2019 Feb 7;380(6):549-558.

Sarkar S, Sujit KM, Singh V, Pandey R, Trivedi S, Singh K, Gupta G, Rajender S. Array-based DNA methylation profiling reveals peripheral blood differential methylation in male infertility. *Fertil Steril.* 2019 Jul;112(1):61-72.e1.

Sasaki T, Nakashiro K, Tanaka H, Azuma K, Goda H, Hara S, Onodera J, Fujimoto I, Tanji N, Yokoyama M, Hamakawa H. Knockdown of Akt



isoforms by RNA silencing suppresses the growth of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Aug 13;399(1):79-83.

Schiell JA, Prekeris R. Making the final cut - mechanisms mediating the abscission step of cytokinesis. *Scientific World Journal*. 2010 Jul 19;10:1424-34.

Schlumberger M, Brose M, Elisei R, Leboulleux S, Luster M, Pitoia F, Pacini F. Definition and management of radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014 May;2(5):356-8.

Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, Robinson B, Brose MS, Elisei R, Habra MA, Newbold K, Shah MH, Hoff AO, Gianoukakis AG, Kiyota N, Taylor MH, Kim SB, Krzyzanowska MK, Dutcus CE, de las Heras B, Zhu J, Sherman SI. Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *N Engl J Med*. 2015 Feb 12;372(7):621-30.

Schmidbauer B, Menhart K, Hellwig D, Grosse J. Differentiated Thyroid Cancer-Treatment: State of the Art. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 17;18(6).

Schmidt A, Cross G, Pitoia F. Metástasis a distancia en cáncer diferenciado de tiroides: Diagnóstico y tratamiento. *Revista argentina de endocrinología y metabolismo*. 2017;54(2):92-100.

Schmidt D, Müller S. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 5;99(5):2872-7.

Schneider TC, de Wit D, Links TP, van Erp NP, van der Hoeven JJ, Gelderblom H, Roozen IC, Bos M, Corver WE, van Wezel T, Smit JW, Morreau H, Guchelaar HJ, Kapiteijn E. Everolimus in Patients With Advanced Follicular-Derived Thyroid Cancer: Results of a Phase II Clinical Trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Feb 1;102(2):698-707.

Schou J, Kelstrup CD, Hayward DG, Olsen JV, Nilsson J. Comprehensive identification of SUMO2/3 targets and their dynamics during mitosis. *PLoS One*. 2014 Jun 27;9(6): e100692.

Schvartz C, Bonnetain F, Dabakuyo S, Gauthier M, Cueff A, Fieffé S, Pochart JM, Cochet I, Crevisy E, Dalac A, Papathanassiou D, Toubreau M. Impact on overall survival of radioactive iodine in low-risk differentiated thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 May;97(5):1526-35.

Sdelci S, Schütz M, Pinyol R, Bertran MT, Regué L, Caelles C, Vernos I, Roig J. Nek9 phosphorylation of NEDD1/GCP-WD contributes to Plk1 control of  $\gamma$ -tubulin recruitment to the mitotic centrosome. *Curr Biol*. 2012 Aug 21;22(16):1516-23.

Seki A, Coppinger JA, Jang CY, Yates JR, Fang G. Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science*. 2008 Jun 20;320(5883):1655-8.

Semple SC, Akinc A, Chen J, Sandhu AP, Mui BL, Cho CK, Sah DW, Stebbing D, Crosley EJ, Yaworski E, Hafez IM, Dorkin JR, Qin J, Lam K, Rajeev KG, Wong KF, Jeffs LB, Nechev L, Eisenhardt ML, Jayaraman M, Kazem M, Maier MA, Srinivasulu M, Weinstein MJ, Chen Q, Alvarez R, Barros SA, De S, Klimuk SK, Borland T, Kosovrasti V, Cantley WL, Tam YK, Manoharan M, Ciufolini MA, Tracy MA, de Fougères A, MacLachlan I, Cullis PR, Madden TD, Hope MJ. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol*. 2010 Feb;28(2):172-6.

Setten RL, Rossi JJ, Han SP. Author Correction: The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Apr 24.

Sewell W, Reeb A, Lin RY. An orthotopic mouse model of anaplastic thyroid carcinoma. *J Vis Exp*. 2013 Apr 17;(74).

Shah MH, Wei L, Wirth LJ, Daniels GA, De Souza JA, Timmers CD, Sexton JL, Beshara M, Nichols D, Snyder N, Devine CE, Konda B, Busaidy NL. Results of randomized phase II trial of dabrafenib versus dabrafenib plus trametinib in BRAF-mutated papillary thyroid carcinoma. *JCO*. 2017 05/20;35(15):6022. Available from: [https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15\\_suppl.6022](https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.6022).

Sharma K, D'Souza RC, Tyanova S, Schaab C, Wiśniewski JR, Cox J, Mann M. Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell Rep*. 2014 Sep 11;8(5):1583-94.

Sharma VK, Raman KS, Sunil KS. Antisense oligonucleotides: modifications and clinical trials. *Med Chem Comm*. 2014 May 10; 1454-1471.

Shen L, Au WY, Wong KY, Shimizu N, Tsuchiyama J, Kwong YL, Liang RH, Srivastava G. Cell death by bortezomib-induced mitotic catastrophe in natural killer lymphoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2008 Dec;7(12):3807-15.

Shen X, Corey DR. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2018 Feb 28;46(4):1584-1600.

Sherman EJ, Ho AL, Fagin JA, Haque S, Robinson C, Ghossein RA, Chen HX, Pfister DG. Combination of dabrafenib (DAB) and lapatinib (LAP) for the treatment of BRAF-mutant thyroid cancer. *JCO*. 2018 05/20;36(15):6087. Available from: [https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15\\_suppl.6087](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.6087).

Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2856-60.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996 Mar 1;68(5):850-8.

Shi B, Keough E, Matter A, Leander K, Young S, Carlini E, Sachs AB, Tao W, Abrams M, Howell B, Sepp-Lorenzino L. Biodistribution of small interfering RNA at the organ and cellular levels after lipid nanoparticle-mediated delivery. *J Histochem Cytochem.* 2011 Aug;59(8):727-40.

Shinbo Y, Niki T, Taira T, Ooe H, Takahashi-Niki K, Maita C, Seino C, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities. *Cell Death Differ.* 2006 Jan;13(1):96-108

Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2005 Aug;5(8):593-605. Review.

Sivaprasad S, Acharya N, Hykin P. Pegaptanib sodium for neovascular age-related macular degeneration: clinical experience in the UK. *Clin Ophthalmol.* 2008 Jun;2(2):347-54.

Smallridge RC, Ain KB, Asa SL, Bible KC, Brierley JD, Burman KD, Kebebew E, Lee NY, Nikiforov YE, Rosenthal MS, Shah MH, Shaha AR, Tuttle RM; American Thyroid Association Anaplastic Thyroid Cancer Guidelines Taskforce. American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer. *Thyroid.* 2012 Nov;22(11):1104-39.

Smallridge RC, Copland JA, Brose MS, Wadsworth JT, Houvras Y, Menefee ME, Bible KC, Shah MH, Gramza AW, Klover JP, Marlow LA, Heckman MG, Von Roemeling R. Efatutazone, an oral PPAR- $\gamma$  agonist, in combination with paclitaxel in anaplastic thyroid cancer: results of a multicenter phase 1 trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jun;98(6):2392-400.

Smallridge RC, Copland JA. Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010 Aug;22(6):486-97.

Smith E, Hégarat N, Vesely C, Roseboom I, Larch C, Streicher H, Straatman K, Flynn H, Skehel M, Hirota T, Kuriyama R, Hochegger H. Differential control of Eg5-dependent centrosome separation by Plk1 and Cdk1. *EMBO J*. 2011 Jun 1;30(11):2233-45.

Soares P, Lima J, Preto A, Castro P, Vinagre J, Celestino R, Couto JP, Prazeres H, Eloy C, Máximo V, Sobrinho-Simões M. Genetic alterations in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *Curr Genomics*. 2011 Dec;12(8):609-17.

Sobrinho-Simões M, Sambade C, Fonseca E, Soares P. Poorly differentiated carcinomas of the thyroid gland: a review of the clinicopathologic features of a series of 28 cases of a heterogeneous, clinically aggressive group of thyroid tumors. *Int J Surg Pathol*. 2002 Apr;10(2):123-31.

Soifer HS, Koch T, Lai J, Hansen B, Hoeg A, Oerum H, Stein CA. Silencing of gene expression by gymnotic delivery of antisense oligonucleotides. *Methods Mol Biol*. 2012; 815:333-46.

Solis-Hernandez MP, Fernandez Del Valle A, Carmona-Bayonas A, Garcia-Carbonero R, Custodio A, Benavent M, Alonso Gordoa T, Nuñez-Valdovino B, Sanchez Canovas M, Matos I, Alonso V, Lopez C, Viudez A, Izquierdo M, Calvo-Temprano D, Grande E, Capdevila J, Jimenez-Fonseca P. Evaluating radiological response in pancreatic neuroendocrine tumours treated with sunitinib: comparison of Choi versus RECIST criteria (CRIPNET\_GETNE1504 study). *Br J Cancer*. 2019 Oct;121(7):537-544.

Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol*. 2005 Jun;23(6):709-17.

Song J, Zhang Z, Hu W, Chen Y. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation. *J Biol Chem*. 2005 Dec 2;280(48):40122-9.

Sosa JA, Elisei R, Jarzab B, Balkissoon J, Lu SP, Bal C, Marur S, Gramza A, Yosef RB, Gitlitz B, Haugen BR, Ondrey F, Lu C, Karandikar SM, Khuri F, Licitra L, Remick SC. Randomized safety and efficacy study of foscetabulin with paclitaxel/carboplatin against anaplastic thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2014 Feb;24(2):232-40.

Steggmaier M, Hoffmann M, Baum A, Lénárt P, Petronczki M, Krssák M, Gürtler U, Garin-Chesa P, Lieb S, Quant J, Grauert M, Adolf GR, Kraut N, Peters JM, Rettig WJ. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr Biol*. 2007 Feb 20;17(4):316-22.

Stein CA, Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol Ther*. 2017 May 3;25(5):1069-1075. Review.

Stein CA, Hansen JB, Lai J, Wu S, Voskresenskiy A, Høg A, Worm J, Hedtjörn M, Souleimanian N, Miller P, Soifer HS, Castanotto D, Benimetskaya L, Ørum H, Koch T. Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jan;38(1): e3.

Stenner F, Liewen H, Zweifel M, Weber A, Tchinda J, Bode B, Samaras P, Bauer S, Knuth A, Renner C. Targeted therapeutic approach for an anaplastic thyroid cancer in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 2008 Sep;99(9):1847-52.

Stenzel KH, Miyata T, Rubin AL. Collagen as a biomaterial. *Annu Rev Biophys Bioeng*. 1974;3(0):231-53. Review.

Stewart E, Federico SM, Chen X, Shelat AA, Bradley C, Gordon B, Karlstrom A, Twarog NR, Clay MR, Bahrami A, Freeman BB 3rd, Xu B, Zhou X, Wu J, Honnell V, Ocarz M, Blankenship K, Dapper J, Mardis ER, Wilson RK, Downing J, Zhang J, Easton J, Pappo A, Dyer

MA. Orthotopic patient-derived xenografts of paediatric solid tumours. *Nature*. 2017 Sep 7;549(7670):96-100.

Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen IS, Hahn WC, Sharp PA, Weinberg RA, Novina CD. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*. 2003 Apr;9(4):493-501.

Storck EM, Özbalci C, Eggert US. Lipid Cell Biology: A Focus on Lipids in Cell Division. *Annu Rev Biochem*. 2018 Jun 20;87:839-869. Review.

Strausfeld U, Fernandez A, Capony JP, Girard F, Lautredou N, Derancourt J, Labbe JC, Lamb NJ. Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis. *J Biol Chem*. 1994 Feb 25;269(8):5989-6000.

Subbiah V, Kreitman RJ, Wainberg ZA, Cho JY, Schellens JHM, Soria JC, Wen PY, Zielinski C, Cabanillas ME, Urbanowitz G, Mookerjee B, Wang D, Rangwala F, Keam B. Dabrafenib and Trametinib Treatment in Patients with Locally Advanced or Metastatic BRAF V600-Mutant Anaplastic Thyroid Cancer. *J Clin Oncol*. 2018 Jan1;36(1):7-13.

Sugitani I, Hasegawa Y, Sugasawa M, Tori M, Higashiyama T, Miyazaki M, Hosoi H, Orita Y, Kitano H. Super-radical surgery for anaplastic thyroid carcinoma: a large cohort study using the Anaplastic Thyroid Carcinoma Research Consortium of Japan database. *Head Neck*. 2014 Mar;36(3):328-33.

Sugitani I, Ito Y, Miyauchi A, Imai T, Suzuki S. Active Surveillance Versus Immediate Surgery: Questionnaire Survey on the Current Treatment Strategy for Adult Patients with Low-Risk Papillary Thyroid Microcarcinoma in Japan. *Thyroid*. 2019 Sep 25.



Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*. 2009 Jul 23;460(7254):529-33.

Tai DJ, Hsu WL, Liu YC, Ma YL, Lee EH. Novel role and mechanism of protein inhibitor of activated STAT1 in spatial learning. *EMBO J*. 2011 Jan 5;30(1):205-20.

Takahashi K, Taira T, Niki T, Seino C, Iguchi-Arigo SM, Ariga H. DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASx alpha to the receptor. *J Biol Chem*. 2001 Oct 5;276(40):37556-63.

Takahashi M, Chiyo T, Okada T, Hohjoh H. Specific inhibition of tumor cells by oncogenic EGFR specific silencing by RNA interference. *PLoS One*. 2013 Aug 8;8(8):e73214.

Takahashi N, Duprez L, Grootjans S, Cauwels A, Nerinckx W, DuHadaway JB, Goossens V, Roelandt R, Van Hauwermeiren F, Libert C, Declercq W, Callewaert N, Prendergast GC, Degterev A, Yuan J, Vandenabeele P. Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Dis*. 2012 Nov 29;3: e437.

Takahashi S, Kiyota N, Yamazaki T, Chayahara N, Nakano K, Inagaki L, Toda K, Enokida T, Minami H, Imamura Y, Fukuda N, Sasaki T, Suzuki T, Ikezawa H, Dutkus CE, Tahara M. A Phase II study of the safety and efficacy of lenvatinib in patients with advanced thyroid cancer. *Future Oncol*. 2019 Mar;15(7):717-726.

Takei Y, Kadomatsu K, Yuzawa Y, Matsuo S, Muramatsu T. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res*. 2004 May 15;64(10):3365-70.

Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, Teratani T, Namatame N, Yamamoto Y, Hanai K, Kato T, Sano A, Ochiya T. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-

metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 23;102(34):12177-82.

Taliec LP, Kirsh O, Lecomte MC, Viengchareun S, Zennaro MC, Dejean A, Lombès M. Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. *Mol Endocrinol*. 2003 Dec;17(12):2529-42.

Tallini G, Giordano TJ. Thyroid gland In: Goldblum JR, Lamps LW, McKenney JK, Myers JL, editors. *Rosai and Ackerman's surgical pathology*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2018. p. 278-354.

Tan J, Hall SH, Hamil KG, Grossman G, Petrusz P, Liao J, Shuai K, French FS. Protein inhibitor of activated STAT-1 (signal transducer and activator of transcription-1) is a nuclear receptor coregulator expressed in human testis. *Mol Endocrinol*. 2000 Jan;14(1):14-26.

Tan JA, Hall SH, Hamil KG, Grossman G, Petrusz P, French FS. Protein inhibitors of activated STAT resemble scaffold attachment factors and function as interacting nuclear receptor coregulators. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):16993-7001.

Tavares C, Melo M, Cameselle-Teijeiro JM, Soares P, Sobrinho-Simões M. ENDOCRINE TUMOURS: Genetic predictors of thyroid cancer outcome. *Eur J Endocrinol*. 2016 Apr;174(4):R117-26.

Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA*. 2005 Apr;11(4):371-82.

Teixidó-Travesa N, Roig J, Lüders J. The where, when and how of microtubule nucleation - one ring to rule them all. *J Cell Sci*. 2012 Oct 1;125(Pt19):4445-56.

Teixidó-Travesa N, Villén J, Lacasa C, Bertran MT, Archinti M, Gygi SP, Caelles C, Roig J, Lüders J. The gammaTuRC revisited: a

comparative analysis of interphase and mitotic human gammaTuRC redefines the set of core components and identifies the novel subunit GCP8. *Mol Biol Cell*. 2010 Nov 15;21(22):3963-72.

Thomas CE, Kelleher NL, Mizzen CA. Mass spectrometric characterization of human histone H3: a bird's eye view. *J Proteome Res*. 2006 Feb;5(2):240-7.

Thoresen SB, Campsteijn C, Vietri M, Schink KO, Liestøl K, Andersen JS, Raiborg C, Stenmark H. ANCHR mediates Aurora-B-dependent abscission checkpoint control through retention of VPS4. *Nat Cell Biol*. 2014 Jun;16(6):550-60.

Thurston TL, Wandel MP, von Muhlinen N, Foeglein A, Randow F. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature*. 2012 Jan 15;482(7385):414-8.

Tiacci E, Park JH, De Carolis L, Chung SS, Broccoli A, Scott S, Zaja F, Devlin S, Pulsoni A, Chung YR, Cimminiello M, Kim E, Rossi D, Stone RM, Motta G, Saven A, Varettoni M, Altman JK, Anastasia A, Grever MR, Ambrosetti A, Rai KR, Fraticelli V, Lacouture ME, Carella AM, Levine RL, Leoni P, Rambaldi A, Falzetti F, Ascani S, Capponi M, Martelli MP, Park CY, Pileri SA, Rosen N, Foà R, Berger MF, Zinzani PL, Abdel-Wahab O, Falini B, Tallman MS. Targeting Mutant BRAF in Relapsed or Refractory Hairy-Cell Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 Oct 29;373(18):1733-47.

Tirkes T, Hollar MA, Tann M, Kohli MD, Akisik F, Sandrasegaran K. Response criteria in oncologic imaging: review of traditional and new criteria. *Radiographics*. 2013 Sep-Oct;33(5):1323-41.

Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev*. 2005 Mar 1;19(5):517-29. Review.

Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep*. 2002 Apr;3(4):341-8.

Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Shinya N, Iwamatsu A, Nishida E. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature*. 2001 Mar 8;410(6825):215-20.

Tuccilli C, Baldini E, Sorrenti S, Di Gioia C, Bosco D, Ascoli V, Mian C, Barollo S, Rendina R, Cocco C, Pepe M, Catania A, Bononi M, Tartaglia F, De Antoni E, D'Armiento M, Ulisse S. Papillary thyroid cancer is characterized by altered expression of genes involved in the sumoylation process. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015 Jul-Sep;29(3):655-62.

Tussié-Luna MI, Bayarsaihan D, Seto E, Ruddle FH, Roy AL. Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family proteins and PIASx $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 1;99(20):12807-12.

Tuttle RM, Haugen B, Perrier ND. Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? *Thyroid*. 2017a Jun;27(6):751-756.

Tuttle RM, Morris LF, Haugen B, Shah J, Sosa JA, Rohren E, Subramaniam RM, Hunt JL, Perrier ND. Thyroid-differentiated and anaplastic carcinoma In: Amin MB, Edge SB, Greene F, Byrd D, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley J, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York: Springer International Publishing. 2017b.

Tuttle RM, Sherman EJ. Anaplastic Thyroid Carcinoma UpToDate. 2019 Jan 18. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/anaplastic-thyroid-cancer>

Ungureanu D, Vanhatupa S, Grönholm J, Palvimo JJ, Silvennoinen O. SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses. *Blood*. 2005 Jul 1;106(1):224-6.

Ungureanu D, Vanhatupa S, Kotaja N, Yang J, Aittomaki S, Jänne OA, Palvimo JJ, Silvennoinen O. PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood*. 2003 Nov 1;102(9):3311-3.

van den Akker E, Ano S, Shih HM, Wang LC, Pironin M, Palvimo JJ, Kotaja N, Kirsh O, Dejean A, Ghysdael J. FLI-1 functionally interacts with PIASxalpha, a member of the PIAS E3 SUMO ligase family. *J Biol Chem*. 2005 Nov 11;280(45):38035-46.

Van der Horst A, Lens SM. Cell division: control of the chromosomal passenger complex in time and space. *Chromosoma*. 2014 Mar;123(1-2):25-42.

Van Dyck F, Delvaux EL, Van de Ven WJ, Chavez MV. Repression of the Transactivating Capacity of the Oncoprotein PLAG1 by SUMOylation. *J Biol Chem*. 2004 Aug 20;279(34):36121-31.

Van Vugt MA, Medema RH. Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene*. 2005 Apr 18;24(17):2844-59. Review.

Varma D, Salmon ED. The KMN protein network--chief conductors of the kinetochore orchestra. *J Cell Sci*. 2012 Dec 15;125(Pt 24):5927-36.

Verdugo A, Vinod PK, Tyson JJ, Novak B. Molecular mechanisms creating bistable switches at cell cycle transitions. *Open Biol*. 2013 Mar 13;3(3):120179.

Visintin R, Prinz S, Amon A. CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science*. 1997 Oct 17;278(5337):460-3.

Vleugel M, Hoogendoorn E, Snel B, Kops GJ. Evolution and function of the mitotic checkpoint. *Dev Cell*. 2012 Aug 14;23(2):239-50.

Volante M, Collini P, Nikiforov YE, Sakamoto A, Kakudo K, Katoh R, Lloyd RV, LiVolsi VA, Papotti M, Sobrinho-Simoes M, Bussolati G, Rosai J. Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for

the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *Am J Surg Pathol*. 2007 Aug;31(8):1256-64.

Wagle N, Grabiner BC, Van Allen EM, Amin-Mansour A, Taylor-Weiner A, Rosenberg M, Gray N, Barletta JA, Guo Y, Swanson SJ, Ruan DT, Hanna GJ, Haddad RI, Getz G, Kwiatkowski DJ, Carter SL, Sabatini DM, Jänne PA, Garraway LA, Lorch JH. Response and acquired resistance to everolimus in anaplastic thyroid cancer. *N Engl J Med*. 2014 Oct 9;371(15):1426-33.

Walter AO, Seghezzi W, Korver W, Sheung J, Lees E. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene*. 2000 Oct 5;19(42):4906-16.

Wang W, Chen Y, Wang S, Hu N, Cao Z, Wang W, Tong T, Zhang X. PIAS $\alpha$  ligase enhances SUMO1 modification of PTEN protein as a SUMO E3 ligase. *J Biol Chem*. 2014 Feb 7;289(6):3217-30.

Wang WJ, Soni RK, Uryu K, Tsou MF. The conversion of centrioles to centrosomes: essential coupling of duplication with segregation. *J Cell Biol*. 2011 May 16;193(4):727-39.

Wang XD, Gong Y, Chen ZL, Gong BN, Xie JJ, Zhong CQ, Wang QL, Diao LH, Xu A, Han J, Altman A, Li Y. TCR-induced sumoylation of the kinase PKC- $\theta$  controls T cell synapse organization and T cell activation. *Nat Immunol*. 2015 Nov;16(11):1195-203.

Wang Y, Li Z, Han Y, Liang LH, Ji A. Nanoparticle-based delivery system for application of siRNA in vivo. *Curr Drug Metab*. 2010 Feb;11(2):182-96. Review.

Wanzel M, Russ AC, Kleine-Kohlbrecher D, Colombo E, Pelicci PG, Eilers M. A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nat Cell Biol*. 2008 Sep;10(9):1051-61.

Ward E, Sherman RL, Henley SJ, Jemal A, Siegel DA, Feuer EJ, Firth AU, Kohler BA, Scott S, Ma J, Anderson RN, Benard V, Cronin K. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1999-2015,

Featuring Cancer in Men and Women ages 20-49. J Natl Cancer Inst. 2019 May 30.

Watts JK, Deleavey GF, Damha MJ. Chemically modified siRNA: tools and applications. Drug Discov Today. 2008 Oct;13(19-20):842-55.

Wei H, Wang X, Gan B, Urvalek AM, Melkounian ZK, Guan JL, Zhao J. Sumoylation delimits KLF8 transcriptional activity associated with the cell cycle regulation. J Biol Chem. 2006 Jun 16;281(24):16664-71.

Wen D, Wu J, Wang L, Fu Z. SUMOylation Promotes Nuclear Import and Stabilization of Polo-like Kinase 1 to Support Its Mitotic Function. Cell Rep. 2017 Nov 21;21(8):2147-2159.

Wheeler LA, Trifonova R, Vrbanc V, Basar E, McKernan S, Xu Z, Seung E, Deruaz M, Dudek T, Einarsson JJ, Yang L, Allen TM, Luster AD, Tager AM, Dykxhoorn DM, Lieberman J. Inhibition of HIV transmission in human cervicovaginal explants and humanized mice using CD4 aptamer-siRNA chimeras. J Clin Invest. 2011 Jun;121(6):2401-12.

Whitehead KA, Sahay G, Li GZ, Love KT, Alabi CA, Ma M, Zurenko C, Querbes W, Langer RS, Anderson DG. Synergistic silencing: combinations of lipid-like materials for efficacious siRNA delivery. Mol Ther. 2011 Sep;19(9):1688-94.

Williams ED. Guest Editorial: Two Proposals Regarding the Terminology of Thyroid Tumors. Int J Surg Pathol. 2000 Jul;8(3):181-183.

Williams MJ, Werner B, Barnes CP, Graham TA, Sottoriva A. Identification of neutral tumor evolution across cancer types. Nat Genet. 2016 Mar;48(3):238-244.

Willoughby JLS, Chan A, Sehgal A, Butler JS, Nair JK, Racie T, Shulga-Morskaya S, Nguyen T, Qian K, Yucius K, Charisse K, van Berkel TJC, Manoharan M, Rajeev KG, Maier MA, Jadhav V, Zimmermann TS. Evaluation of GalNAc-siRNA Conjugate Activity in



Pre-clinical Animal Models with Reduced Asialoglycoprotein Receptor Expression. *Mol Ther.* 2018 Jan 3;26(1):105-114.

Wittrup A, Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet.* 2015 Sep;16(9):543-52.

Wong KA, Kim R, Christofk H, Gao J, Lawson G, Wu H. Protein inhibitor of activated STAT Y (PIASy) and a splice variant lacking exon 6 enhance sumoylation but are not essential for embryogenesis and adult life. *Mol Cell Biol.* 2004 Jun;24(12):5577-86.

Wong SC, Klein JJ, Hamilton HL, Chu Q, Frey CL, Trubetskoy VS, Hegge J, Wakefield D, Rozema DB, Lewis DL. Co-injection of a targeted, reversibly masked endosomolytic polymer dramatically improves the efficacy of cholesterol-conjugated small interfering RNAs in vivo. *Nucleic Acid Ther.* 2012 Dec;22(6):380-90.

Wu L, Wu H, Ma L, Sangiorgi F, Wu N, Bell JR, Lyons GE, Maxson R. Miz1, a novel zinc finger transcription factor that interacts with Msx2 and enhances its affinity for DNA. *Mech Dev.* 1997 Jul;65(1-2):3-17.

Wu SY, Chiang CM. Crosstalk between sumoylation and acetylation regulates p53-dependent chromatin transcription and DNA binding. *EMBO J.* 2009 May 6;28(9):1246-59.

Wu Y, Wang W, Chen Y, Huang K, Shuai X, Chen Q, Li X, Lian G. The investigation of polymer-siRNA nanoparticle for gene therapy of gastric cancer in vitro. *Int J Nanomedicine.* 2010 Mar 9;5:129-36.

Wu ZW, Chien CT, Liu CY, Yan JY, Lin SY. Recent progress in copolymer-mediated siRNA delivery. *J Drug Target.* 2012 Aug;20(7):551-60.

Wunderlich A, Roth S, Ramaswamy A, Greene BH, Brendel C, Hinterseher U, Bartsch DK, Hoffmann S. Combined inhibition of cellular pathways as a future therapeutic option in fatal anaplastic thyroid cancer. *Endocrine.* 2012 Dec;42(3):637-46.

Wurzenberger C, Gerlich DW. Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jul 13;12(8):469-82.

Xiao Z, Li G, Chen Y, Li M, Peng F, Li C, Li F, Yu Y, Ouyang Y, Xiao Z, Chen Z. Quantitative proteomic analysis of formalin-fixed and paraffin-embedded nasopharyngeal carcinoma using iTRAQ labeling, two-dimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *J Histochem Cytochem*. 2010 Jun;58(6):517-27.

Xing Z, Lin A, Li C, Liang K, Wang S, Liu Y, Park PK, Qin L, Wei Y, Hawke DH, Hung MC, Lin C, Yang L. lncRNA directs cooperative epigenetic regulation downstream of chemokine signals. *Cell*. 2014 Nov 20;159(5):1110-1125. 13.

Xu S, Peng G, Wang Y, Fang S, Karbowski M. The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. *Mol Biol Cell*. 2011 Feb 1;22(3):291-300.

Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*. 2019 Jan 18;39(1).

Yan W, Santti H, Jänne OA, Palvimo JJ, Toppari J. Expression of the E3 SUMO-1 ligases PIASx and PIAS1 during spermatogenesis in the rat. *Gene Expr Patterns*. 2003 Jun;3(3):301-8.

Yang SH, Sharrocks AD. PIASx acts as an Elk-1 coactivator by facilitating derepression. *EMBO J*. 2005 Jun 15;24(12):2161-71.

Yang SH, Sharrocks AD. PIASx $\alpha$  differentially regulates the amplitudes of transcriptional responses following activation of the ERK and p38 MAPK pathways. *Mol Cell*. 2006 May 19;22(4):477-87.

Ye Y, Shibata Y, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Rapoport TA. Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 4;102(40):14132-8.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003 Dec 15;17(24):3011-6.

Yim H. Current clinical trials with polo-like kinase 1 inhibitors in solid tumors. *Anticancer Drugs.* 2013 Nov;24(10):999-1006.

Yin W, Rogge M. Targeting RNA: A Transformative Therapeutic Strategy. *Clin Transl Sci.* 2019 Mar;12(2):98-112. Review.

Yorke E, Melck A, Wiseman SM. Impact of sex on the clinicopathological characteristics and prognosis of papillary thyroid cancer. *Can J Surg.* 2016 Aug;59(4):287-8.

Yoshida A, Sugino K, Sugitani I, Miyauchi A. Anaplastic thyroid carcinomas incidentally found on postoperative pathological examination. *World J Surg.* 2014 Sep;38(9):2311-6.

Yu AM, Jian C, Yu AH, Tu MJ. RNA therapy: Are we using the right molecules? *Pharmacol Ther.* 2019 Apr;196:91-104.

Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 30;99(9):6047-52.

Yu MG, Rivera J, Jimeno C. Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma: 10-Year Experience in a Southeast Asian Population. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2017 Jun;32(2):288-295.

Yunus AA, Lima CD. Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Mol Cell.* 2009 Sep 11;35(5):669-82.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* 2000 Mar 31;101(1):25-33.

Zaytsev AV, Sundin LJ, DeLuca KF, Grishchuk EL, DeLuca JG. Accurate phosphoregulation of kinetochore-microtubule affinity requires unconstrained molecular interactions. *J Cell Biol.* 2014 Jul 7;206(1):45-59.

Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.* 2005 Jan 12;24(1):138-48.

Zhang L, Zhang Y, Mehta A, Boufraquech M, Davis S, Wang J, Tian Z, Yu Z, Boxer MB, Kiefer JA, Copland JA, Smallridge RC, Li Z, Shen M, Kebebew E. Dual inhibition of HDAC and EGFR signaling with CUDC-101 induces potent suppression of tumor growth and metastasis in anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget.* 2015 Apr 20;6(11):9073-85.

Zhao B, Smallwood A, Yang J, Koretke K, Nurse K, Calamari A, Kirkpatrick RB, Lai Z. Modulation of kinase-inhibitor interactions by auxiliary protein binding: crystallography studies on Aurora A interactions with VX-680 and with TPX2. *Protein Sci.* 2008 Oct;17(10):1791-7.

Zhao H, Tanaka T, Halicka HD, Traganos F, Zarebski M, Dobrucki J, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of DNA damage by exogenous and endogenous oxidants reports aging-related processes. *Cytometry A.* 2007 Nov;71(11):905-14.

Zhao Q, Xie Y, Zheng Y, Jiang S, Liu W, Mu W, Liu Z, Zhao Y, Xue Y, Ren J. GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jul;42(Web Server issue): W325-30.

Zhao Z, Shen GH, Liu B, Kuang AR. Unusual Adrenal and Brain Metastases From Follicular Thyroid Carcinoma Revealed by 131I SPECT/CT. *Clin Nucl Med.* 2016 Jan;41(1):e53-5.

Zhao ZS, Lim JP, Ng YW, Lim L, Manser E. The GIT-associated kinase PAK targets to the centrosome and regulates Aurora-A. *Mol Cell*. 2005 Oct 28;20(2):237-49.

Zheng Y, Sheng S, Wang H, Jia X, Hu Y, Qian Y, Zhu Y, Wang J. Identification of Pold2 as a novel interaction partner of protein inhibitor of activated STAT2. *Int J Mol Med*. 2012 Oct;30(4):884-8.

Zheng Y, Zhou ZM, Yin LL, Li JM, Sha JH. Molecular cloning and characterization of a novel splicing variant of PIASx. *Acta Pharmacol Sin*. 2004 Aug;25(8):1058-64.

Zhu X, Enomoto K, Zhao L, Zhu YJ, Willingham MC, Meltzer P, Qi J, Cheng SY. Bromodomain and Extraterminal Protein Inhibitor JQ1 Suppresses Thyroid Tumor Growth in a Mouse Model. *Clin Cancer Res*. 2017 Jan 15;23(2):430-440.

Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H, Nakagawara A. Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *J Clin Invest*. 2013 Jul;123(7):2935-47.

Zhuo S, Clemens JC, Stone RL, Dixon JE. Mutational analysis of a Ser/Thr phosphatase. Identification of residues important in phosphoesterase substrate binding and catalysis. *J Biol Chem*. 1994 Oct 21;269(42):26234-8.

Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Röhl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliensky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*. 2006 May 4;441(7089):111-4.

Zitouni S, Nabais C, Jana SC, Guerrero A, Bettencourt-Dias M. Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jul;15(7):433-52. Review.

Zivaljevic V, Tausanovic K, Paunovic I, Diklic A, Kalezic N, Zoric G, Sabljak V, Vekic B, Zivic R, Marinkovic J, Sipetic S. Age as a prognostic factor in anaplastic thyroid cancer. *Int J Endocrinol.* 2014; 2014:240513.



## Lista de Imágenes

	<i>pág</i>
<b>Imagen I.1.</b> Esquema de la ruta del RNA de interferencia mediado por siRNA.	66
<b>Imagen I.2.</b> Esquema de la ruta del RNA de interferencia mediado por shRNA.	68
<b>Imagen I.3.</b> Mecanismos de regulación de los genes por oligonucleótidos antisentido (ASO).	70
<b>Imagen I.4.</b> Mecanismo de silenciamiento de genes por siRNA.	74
<b>Imagen I.5.</b> Fases del ciclo celular.	86
<b>Imagen I.6.</b> Esquema del ciclo celular con sus diferentes etapas.	87
<b>Imagen I.7.</b> Entrada de la mitosis (a) y checkpoint G2/M (b).	90
<b>Imagen I.8.</b> Modelo de ensamblaje del $\gamma$ TuRC.	91
<b>Imagen I.9.</b> Modelo de amplificación que explica la función del complejo de anillos de tubulina- $\gamma$ en el huso mitótico.	92
<b>Imagen I.10.</b> Ciclo del centrosoma.	94
<b>Imagen I.11.</b> Velocidad y fidelidad en la división celular.	95
<b>Imagen I.12.</b> Funcionamiento del checkpoint del ensamblaje del huso (SAC).	97
<b>Imagen I.13.</b> Proteínas y estructura de los dominios en las células mitóticas de los kinetocoros de los vertebrados.	99
<b>Imagen I.14.</b> Señalización del SAC en la red KMN.	100
<b>Imagen I.15.</b> Silenciamiento del SAC en los kinetocoros.	102
<b>Imagen I.16.</b> Acoplamiento de la activación de la kinasa Aurora B con la formación del CPC y su localización.	104
<b>Imagen I.17.</b> Citokinesis regulada por PLK1.	107
 <b>Imagen V.1.</b> La expresión de PIAS2 es un marcador de supervivencia en Carcinoma Diferenciado de Tiroides.	 368





## Lista de Figuras

*pág*

<b>Figura IV.1.</b> Estudio de expresión diferencial mediante 2D-proteómica entre cultivos de tejido normal/benigno y de carcinoma papilar de tiroides.	204
<b>Figura IV.2.</b> Líneas celulares comerciales.	215
<b>Figura IV.3.</b> Estandarización de una transfección eficiente en los distintos modelos celulares usados en este trabajo.	216
<b>Figura IV.4.</b> La proteína PIAS2 y sus isoformas. Caracterización y validación de dos anticuerpos.	225
<b>Figura IV.5.</b> Expresión de PIAS2b y PIAS2a en tejidos de tiroides humano normal, de proliferación benigna y cáncer.	227
<b>Figura IV.6.</b> Expresión de PIAS2 global y de sus distintas isoformas tras RNAseq en un análisis comparativo “cáncer” frente a “benigno” de un paciente de carcinoma anaplásico de tiroides.	229
<b>Figura IV.7.</b> PIAS2b dsRNAi inhibe la proliferación de líneas de carcinoma anaplásico de tiroides.	235
<b>Figura IV.8.</b> Cultivos primarios de tejido benigno (T-MNG) y de carcinoma anaplásico establecidos a partir de fragmentos independientes de sobrantes quirúrgicos de dos pacientes operados por esta enfermedad.	243
<b>Figura IV.9.</b> PIAS2b dsRNAi 1 inhibe el crecimiento de cultivos primarios anaplásicos de pacientes, pero no de sus cultivos normales, de bocio o de carcinoma diferenciado.	246
<b>Figura IV.10.</b> PIAS2b dsRNAi 1 tiene un efecto que dura aproximadamente 5 días en línea celular.	250
<b>Figura IV.11.</b> PIAS2b dsRNAi 1, 2 o la combinación de 1+2 a la mitad de dosis (70 nM).	252
<b>Figura IV.12.</b> Sobreexpresión de PIAS2 en cualquiera de sus dos isoformas de la proteína causa toxicidad en las células anaplásicas de tiroides.	257
<b>Figura IV.13.</b> La expresión de shRNA contra PIAS2 en células CAL-62 reduce la proliferación impidiendo la división celular, pero el efecto es moderado y poco duradero en el tiempo.	266
<b>Figura IV.14.</b> Efecto de oligonucleótidos comerciales as-LNA-GapmeR en la represión de PIAS2 y sus efectos en proliferación.	269

<b>Figura IV.15.</b> PIAS2b dsRNAi 1 induce muerte celular que no es por apoptosis, piroptosis, autofagia o necroptosis.	275
<b>Figura IV.16.</b> PIAS2b dsRNAi induce catástrofe mitótica en cultivos primarios de cáncer anaplásico de tiroides.	277
<b>Figura IV.17.</b> PIAS2b dsRNAi induce catástrofe mitótica en líneas celulares de cáncer anaplásico de tiroides.	283
<b>Figura IV.18.</b> PIAS2b dsRNAi induce catástrofe mitótica en la línea celular de cáncer de tiroides pobremente diferenciado BCPAP.	289
<b>Figura IV.19.</b> Localización de PIAS2 en el huso mitótico.	299
<b>Figura IV.20.</b> Proteínas que se unen a PIAS2 en mitosis identificadas mediante proteómica global.	307
<b>Figura IV.21.</b> PIAS2 y AURKA colocalizan en mitosis en carcinoma anaplásico de tiroides.	311
<b>Figura IV.22.</b> PIAS2 dsRNAi 1 impide la progresión de la mitosis, alterando el huso.	317
<b>Figura IV.23.</b> Modelo <i>in vivo</i> de carcinoma anaplásico de tiroides con Xenograft derivado de Paciente ortotópico (oPDX).	332
<b>Figura IV.24.</b> PIAS2 dsRNAi 1 tiene acción anticancerosa <i>in vivo</i> .	334
<b>Figura V.1</b> Metafase de una célula 8305C en mitosis (ampliación de la Foto mostrada en Resultados, Figura IV.20).	362

## Lista de Tablas

	<i>pág</i>
<b>Tabla I.1a.</b> Clasificación de la OMS de los tumores tiroideos.	45
<b>Tabla I.1b.</b> Variantes de carcinoma papilar de tiroides.	46
<b>Tabla III.1.</b> El medio de cultivo “Humanized Seven Homeostatic Additives” h7H (Bravo et al, 2013).	120
<b>Tabla III.2.</b> Relación del número de células sembradas en distintas placas de cultivo.	124
<b>Tabla III.3.</b> Inhibidores de muerte celular.	126
<b>Tabla III.4.</b> Reactivos de la solución tinción DAPI.	128
<b>Tabla III.5.</b> Secuencias de as-LNA-GapmeR.	137
<b>Tabla III.6.</b> Preparación de medios LB y placas de LB-agar.	140
<b>Tabla III.7.</b> Transfección con Amaxa de las líneas celulares.	141
<b>Tabla III.8.</b> Transfección con Lípidos de las líneas celulares y cultivos primarios.	143
<b>Tabla III.9.</b> Relación de cantidades utilizadas para la transfección con Turbofect.	145
<b>Tabla III.10.</b> Relación de cantidades utilizadas para la transfección con Viafect.	145
<b>Tabla III.11.</b> Plásmidos utilizados en este trabajo.	146
<b>Tabla III.12.</b> Componentes de los lentivirus y retrovirus.	148
<b>Tabla III.13.</b> Preparación del medio de cultivo completo para la línea HEK293FT.	149
<b>Tabla III.14.</b> Preparación de los reactivos 2xHBSS y CaCl <sub>2</sub> .	150
<b>Tabla III.15.</b> Cálculo del título viral.	154
<b>Tabla III.16.</b> Concentración Puromicina para seleccionar en cada línea celular.	156
<b>Tabla III.17.</b> Reactivos para el Ensayo TaqMan y Sybr.	161
<b>Tabla III.18.</b> Primers usados en el trabajo.	162
<b>Tabla III.19.</b> Relación de anticuerpos primarios utilizados en la inmunodetección	166
<b>Tabla III.20.</b> Relación de anticuerpos secundarios utilizados en la inmunodetección.	168
<b>Tabla III.21.</b> Preparación del tampón de <i>Schlessinger</i> de proteínas.	169

<b>Tabla III.22.</b> Tampón de <i>Schlessinger</i> necesario para cada pocillo.	170
<b>Tabla III.23.</b> Preparación de geles SDS-PAGE.	171
<b>Tabla III.24.</b> Tampones para la transferencia de geles SDS-PAGE.	172
<b>Tabla III.25.</b> Soluciones de bloqueo utilizadas en la inmunodetección.	173
<b>Tabla III.26.</b> Anticuerpos primarios (Ab 1º) de PIAS2 que han sido sometidos a validación.	176
<b>Tabla III.27. Solución de lavado de los inmunoprecipitados.</b>	177
<b>Tabla III.28.</b> Pasadas correspondientes a cada canal con su respectivo fluoróforo y longitudes de onda de excitación y emisión con los láseres.	185
<b>Tabla III.29.</b> Preparación de la anestesia Ketamina/Xilacina para los ratones.	187
<b>Tabla IV.1.</b> Características de los tejidos de origen de los cultivos utilizados en el estudio de 2D-proteómica.	200
<b>Tabla IV.2.</b> Proteínas no redundantes identificadas en el estudio de proteómica global que no mostraron diferencias cuantitativas entre cultivos benignos y cancerosos.	205
<b>Tabla IV.3.</b> El gen de PIAS2 humano: sus isoformas de mRNA y proteína.	207
<b>Tabla IV.4.</b> Ensayo PIAS2 global: isoformas que detecta marcadas en naranja.	209
<b>Tabla IV.5.</b> Ensayos PIAS2b (TaqMan y Sybr): isoformas que detectan marcadas en naranja.	210
<b>Tabla IV.6.</b> Ensayos PIAS2a (TaqMan y Sybr): isoformas que detectan marcadas en naranja.	211
<b>Tabla IV.7.</b> Perfil de identificación genética con 16 STRs de las líneas celulares utilizadas en este estudio. Comparación con la base de datos Expasy-Cellosaurus.	212
<b>Tabla IV.8.</b> Líneas celulares comerciales utilizadas y sus características.	214
<b>Tabla IV.9.</b> Diseño y secuencias de dsRNAi para PIAS2 y de la secuencia control sin diana (off-target), y localización en el PIAS2b 3' UTR.	236
<b>Tabla IV.10.</b> PIAS2b dsRNAi: isoformas de PIAS2 reconocidas.	237
<b>Tabla IV.11.</b> Perfil genético de algunos cultivos (T-) comparados con sus tejidos de origen (TH-).	241
<b>Tabla IV.12.</b> Cultivos primarios de carcinoma: características de sus pacientes de origen.	245
<b>Tabla IV.13.</b> Porcentaje máximo de inhibición del crecimiento celular y el día de mayor inhibición de los tratamientos con PIAS2 dsRNAi 1, 2 o su combinación frente a ns-dsRNAi.	255
<b>Tabla IV.14.</b> Isoformas de mRNA de PIAS2 sobre las que actúa T-PIAS2_shRNA.	260

**Tabla IV.15.** Proteínas identificadas en proteómica global de los grupos de Reactome v68: mitosis, SUMOiladas y centrosoma. 302

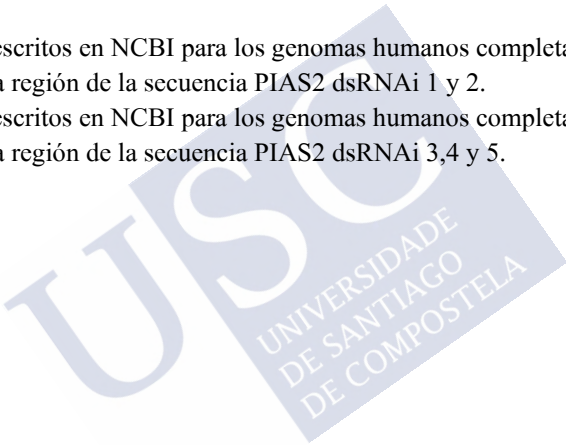
**Tabla V.1.** Relación entre niveles de expresión de mRNA de PIAS2 y pronóstico de cáncer. 369

**Tabla V.2.** Cruce de datos entre nuestros resultados de proteómica y el trabajo de que investiga proteínas SUMOiladas en mitosis en células HeLa (Schou et al, 2014). 383

**Tabla V.3.** Predicción de sitios covalentes de SUMOilación y no covalentes SIMs (SUMO-interaction motifs) de las Proteínas identificadas en proteómica global relacionadas con la mitosis usando los programas de predicción JASSA v4 y GPS-SUMO 1.0. 390

**Tabla V.4.** SNPs descritos en NCBI para los genomas humanos completamente secuenciados para la región de la secuencia PIAS2 dsRNAi 1 y 2. 396

**Tabla V.5.** SNPs descritos en NCBI para los genomas humanos completamente secuenciados para la región de la secuencia PIAS2 dsRNAi 3,4 y 5. 397







# Apéndices

**Apéndice 1. Proteínas identificadas en proteómica global de los grupos de REACTOME: mitosis, SUMOiladas y centrosoma. UPS, Unused ProtScore; Global FDR 1%; 92,6% confidence: al menos 1 péptido con >95% confianza.**

Entry	Entry Name 1-A-FM	UPS	Entry	Entry Name FN-PAF	UPS	Entry	Entry Name PAI-SPB	UPS	Entry	Entry Name SPC-Z	UPS
P13746	1A11	2,14	Q53EP0	FND3B	2,35	P05121	PAI1	29,22	Q8NBT2	SPC24	5,92
Q07000	1C15	11,12	Q5VW36	FOCAD	8,05	Q8NC51	PAIRB	48,99	AI1X283	SPD2B	2,78
Q14738	2A5D	22,49	P14324	FPPS	7,03	Q96013	PAK4	2,01	P19623	SPEE	15,09
Q16537	2A5E	3,19	Q9P282	FPRP	28,07	Q8WX93	PALLD	4	Q75934	SPF27	4
Q13362	2A5G	2,13	Q14331	FRG1	6,21	Q9NVE7	PANK4	8,6	Q9NZQ3	SPN90	3,58
P30153	2AAA	36,39	P02794	FRH	1,58	Q96RD7	PANX1	3,41	Q9NS26	SPNXA	1,33
P63151	2ABA	14,81	Q94915	FRYL	24,49	Q9NVV4	PAPD1	2,02	P49903	SPS1	2,48
P29372	3MG	2,52	Q16658	FSCN1	44,04	Q43252	PAPS1	2,53	Q9NUQ6	SPS2L	26,77
P08195	4F2	9,2	Q96AE4	FURP1	1,38	Q95340	PAPS2	16,88	P52788	SPSY	27,82
P52209	6PGD	46,27	Q92945	FUBP2	35,09	Q99497	PARK7	3,78	Q8TB22	SPT20	1,66
Q95336	6PGL	3,99	Q96124	FUBP3	18,25	Q9UKK3	PARP4	20,08	Q01082	SPTB2	6,86
Q81Z83	A16A1	16,4	P35637	FUS	22,72	Q8BT89	PATL1	4,8	Q15269	SPTC1	12,46
Q676U5	A16L1	2,43	P51116	FXR2	4,38	Q06710	PAX8	9,34	Q15270	SPTC2	5,21
Q9NRG9	AAAS	11,14	Q96CU9	FXRD1	2,97	P49023	PAXI	5,58	Q13813	SPTN1	11,32
Q15758	AAAT	3,52	Q13283	G3BP1	37,88	Q9BVG4	PBDC1	1,67	Q9Y6N5	SQOR	36,71
P54619	AAKG1	2,28	Q9UN86	G3BP2	8,87	Q8NF37	PCAT1	2,21	Q13501	SQSTM	11,24
Q13131	AAPK1	1,91	Q14556	G3PT	2,02	P57721	PCBP3	2	Q15042	SR140	6,74
Q9Y312	AAR2	3,51	P11413	G6PD	39,75	Q15645	PCB2	20,59	Q14247	SRG8	46,07
Q9UDR5	AASS	5,68	P06744	G6PI	16,6	Q5JVF3	PCID2	3,7	Q72687	SRGP1	5,16
Q7Z5R6	AB11P	8,82	Q14976	GAK	4,4	Q16822	PCCKM	15,65	P37108	SRP14	15,87
Q9UH17	ABC3B	2,05	Q14376	GALE	14,56	P12004	PCNA	28,22	P09132	SRP19	2,93
Q95342	ABCB8	2,02	P51570	GALK1	11,87	Q8WW12	PCNP	2,01	P61011	SRP54	2,04
P28288	ABCD3	2,09	Q10471	GALT2	2,93	Q75340	PCDC6	1,91	Q9UH89	SRP68	36,81
P61221	ABCE1	27,41	Q14C86	GAPD1	15,15	Q6L807	PDE12	7,75	Q76094	SRP72	37,43
Q8NE71	ABCF1	62,89	Q9NY12	GAR1	1,56	P07237	PDIA1	7,67	Q96584	SRPK1	14,74
Q9NUQ8	ABCF3	5,59	P41250	GARS	38,45	P30101	PDIA3	4,56	P08240	SRPRA	26,1
Q8N2K0	ABD12	4,45	P62879	GBB2	2,46	Q14554	PDIA5	27,16	Q9Y5M8	SRPR8	17,55
Q961U4	ABHEB	3,32	Q92538	GBF1	16,32	Q9BY77	PDIP3	4,19	Q9GZ74	SRR	1,91
Q8IZP0	ABI1	12,88	P32456	GBP2	2,43	Q15118	PDK1	4,11	Q8YB3	SRRM1	4,2
Q12979	ABR	10,25	Q92947	GCDH	3,87	Q00151	PDLI1	4,03	Q9UQ35	SRRM2	13,92
Q15018	ABRX2	1,71	Q92616	GCN1	138,7	P50479	PDLI4	2,12	Q9BXPS	SRRRT	12,12
Q13085	ACACA	11,59	Q9BSJ2	GCP2	10,51	Q96HC4	PDLI5	9,09	Q75494	SRS10	2,06
Q9H845	ACAD9	2,68	Q96CW5	GCP3	5,71	Q29RF7	PDSSA	14,98	Q05519	SRS11	2,9
P11310	ACADM	8,61	P50395	GDI8	36,91	Q9NTI5	PDSSB	4,62	Q07955	SRSF1	21,57
Q96019	ACL6A	2,08	P52306	GDS1	10,03	Q6P996	PDXD1	9,16	Q01130	SRSF2	6,86
Q9NPJ3	ACO13	2,55	P06396	GELS	2,33	Q9UBV8	PEF1	5,55	P84103	SRSF3	15,85
Q14734	ACOT8	5,55	P57678	GEM14	9,53	Q9BRX2	PELO	3,44	Q13243	SRSF5	3,86
Q9Y305	ACOT9	31,77	Q8TEQ6	GEM15	11,48	Q81ZL8	PELP1	3,17	Q13247	SRSF6	13,82
Q15254	ACOX3	1,67	Q06210	GFPT1	39,57	Q00541	PESC	9,89	Q16629	SRSF7	8,88
P13798	ACPH	9,64	Q9UJY4	GGA2	2,03	P17858	PFKAL	47,98	Q13242	SRSF9	4,1
Q4L235	ACSF4	2	Q6Y7W6	GGYF2	7,27	P08237	PFKAM	17,01	Q04837	SSBP	3,28
P33121	ACSL1	9,41	Q8N2G8	GHDC	1,72	Q96G03	PGM2	35,38	P43307	SSRA	3,03
Q95573	ACSL3	28,72	Q9NWU2	GID8	1,51	Q6PCE3	PGM2L	7,38	P51571	SSRD	7,86
Q60488	ACSL4	15,53	Q9Y2X7	GIT1	7,93	Q15124	PGM5	9,22	Q9UNL2	SSRG	2
Q562R1	ACTBL	2	Q14161	GIT2	2,06	Q9H814	PHAX	2	Q08945	SSRP1	36,43
P12814	ACTN1	11,01	Q9Y223	GLCNE	3,46	Q81WS0	PHF6	6,95	Q8IZP2	ST134	2,22
P61163	ACTZ	15,28	Q92990	GLMN	4,01	Q8WV24	PHLA1	2,01	Q8N3U4	STAG2	4,75
Q00116	ADAS	16,37	P34896	GLYC	3,4	Q53GA4	PHLA2	2,06	Q92783	STAM1	8,78
P35611	ADDA	6,84	Q60547	GMDS	14,28	Q99570	PI3R4	10,9	Q75886	STAM2	4,21
Q9UEY8	ADDG	2,14	Q961J6	GMPPA	13,45	P48426	PI42A	7,5	P42224	STAT1	43,93
P11766	ADHX	16,51	Q9Y5P6	GMPPB	3,24	P42356	PI4KA	4,25	P52630	STAT2	6,66
Q9NRN7	ADPPT	7,87	P29992	GNA11	8,41	Q75928	PIAS2	2,28	P40763	STAT3	25,95
Q16186	ADRM1	6,83	Q14344	GNA13	3,74	Q13492	PICAL	18,49	P42226	STAT6	18,63
P55196	AFAD	1,78	P50148	GNAQ	2,54	Q96552	PIGS	2,01	Q95793	STAU1	37,37
Q8NB90	AFG2H	2,13	P63092	GNAS2	5,87	Q969N2	PIGT	11,84	Q9NUL3	STAU2	8,24
Q9Y4W6	AFG32	6	P36915	GNL1	23,14	Q9H490	PIGU	2,01	Q13586	STIM1	3,67
P52594	AGFG1	5,16	Q9BVP2	GNL3	7,76	Q9NWS0	PIHD1	2	Q9P246	STIM2	1,38

Q95394	AGM1	24.84	Q08379	GOGA2	4.29	P22061		6.1	P31948	STIP1	3.97
Q9UKV8	AGO2	8.54	Q08378	GOGA3	18.55	Q9NWT1	PK11P	3.97	Q94804	STK10	12.42
Q8IVF2	AHNK2	50.99	Q9H8Y8	GORS2	1.55	Q8TD55	PKHO2	2	Q9Y6E0	STK24	15.55
Q95433	AHSA1	12.5	Q9Y3E0	GOT1B	6.65	Q16512	PKN1	7.43	Q00506	STK25	2.77
Q12904	AIMP1	16.5	P43304	GPDM	8	Q16513	PKN2	4.36	Q9UEW8	STK39	5.7
Q13155	AIMP2	16.26	Q92643	GP18	2.81	Q9Y263	PLAP	9.08	Q13043	STK4	3.29
Q00170	AIP	2.66	Q9HCN4	GPN1	2	Q01970	PLCB3	5.28	Q9UJZ1	STML2	2.01
Q02952	AKA12	20.48	Q9H3H5	GPT	1.82	Q15147	PLCB4	2.96	P16949	STMN1	3.86
Q9Y2D5	AKAP2	27.6	Q8TED1	GPX8	5.83	P19174	PLCG1	25.32	Q9Y3F4	STRAP	7.08
Q12802	AKP13	8.18	P28799	GRN	6.76	P16885	PLCG2	19.61	Q5VSL9	STRP1	2.58
P31749	AKT1	7.51	Q12849	GRSF1	2.12	Q15149	PLEC	7.13	P46977	STT3A	18.1
P30837	AL1B1	4.51	Q9BQ67	GRWD1	11.16	P53350	PLK1	5.02	Q8TCJ2	STT3B	5.65
P49419	AL7A1	8.22	P57764	GSDMD	8.38	Q02809	PLOD1	37.75	Q13190	STX5	3.02
Q9BT22	ALG1	2.29	P48507	GSHO	6.13	Q00469	PLOD2	12.97	P61764	STXB1	15.19
Q92685	ALG3	1.8	P48637	GSHB	2	Q60568	PLOD3	2.96	Q15833	STXB2	4.65
Q9H4A4	AMPB	33.63	P49841	GSK3B	8.73	Q8IY17	PLP6	21.03	Q00186	STXB3	5.93
Q01433	AMPD2	1.32	P78417	GSTO1	1.83	Q96G00	PLPP	4.99	Q9P2R7	SUBC1	9.04
Q9P2R3	ANFY1	9.6	Q8NBJ5	GT251	2.15	Q43660	PLRG1	8.17	Q06330	SUH	2.52
Q9NQW6	ANLN	4.36	P78347	GT2F1	14.06	P13797	PLST	28.75	Q9UJH9	SUN2	9.11
Q99873	ANM1	2.09	Q00178	GTPB1	7.6	Q9UIW2	PLX1	2.62	Q53LP3	SWAHC	4.26
Q60678	ANM3	1.71	P11166	GTR1	3.65	P29590	PML	9	P49588	SYAC	25.09
Q14744	ANM5	10.15	P49915	GUA	2.73	Q9NRX1	PNO1	10.57	Q5JTZ9	SYAM	7.62
Q15084	ANR28	20.89	Q02846	GUC2D	1.88	Q15165	PON2	3.94	P49589	SYCC	7.72
P01008	ANT3	1.67	Q8N442	GUF1	2	Q99575	POP1	19.91	Q9HA77	SYCM	2
P58335	ANTR2	2.07	Q96GX5	GWL	12.08	P62136	PP1A	34.57	P14868	SYDC	51.23
Q04083	ANXA1	31.7	P13807	GYS1	13.85	P62140	PP1B	4.94	Q6ZW31	SYDE1	2.91
Q10567	AP1B1	7.65	P07305	H10	1.79	P36873	PP1G	3.09	Q6P148	SYDM	5.31
Q43747	AP1G1	13.76	P16401	H15	13.64	Q96Q00	PP1RA	4.26	P07814	SEYP	111.7
Q9BX55	AP1M1	22.16	Q92522	H1X	7.62	P67775	PP2AA	23.06	Q9HC57	SYF1	1.59
P61966	AP1S1	1.45	P57053	H2F85	11.03	Q08209	PP2BA	2.11	Q9Y285	SYFA	23.98
Q95782	AP2A1	38.15	Q9P035	HACD3	6.91	Q8TF05	PP4R1	9.48	Q9MSD9	SYFB	42.18
Q94973	AP2A2	14.76	Q13442	HAP28	8.13	Q9UPN7	PP6R1	1.57	P12081	SYHC	1.76
P63010	AP2B1	71.92	Q14929	HAT1	5.77	Q5H9R7	PP6R3	18.34	P41252	SYIC	93.57
Q96CW1	AP2M1	34.47	Q9H6D7	HAUS4	2.01	P48147	PPCE	6.34	Q9NSE4	SYIM	4.1
Q00203	AP3B1	22.88	Q724H7	HAUS6	4.26	P10619	PPGB	2.05	Q15046	SYK	23.72
Q14617	AP3D1	6.2	Q9BT25	HAUS8	2	P62937	PP1A	3.66	Q9P2J5	SYLC	73.29
Q9Y272	AP3M1	12.46	Q9Y450	HBS1L	1.7	P23284	PP1B	27.76	P56192	SYMC	53.19
Q92572	AP3S1	4.37	P51610	HCFC1	14.15	Q13427	PP1G	1.51	Q92797	SYMPK	2.67
Q14727	APAF	2.12	P42858	HD	12.86	Q43447	PP1H	2	Q43776	SYNC	25.45
Q9H1A4	APC1	3.55	Q13547	HDAC1	8.24	Q8WUJ2	PP1L4	9.14	Q96I59	SYNM	5.76
Q9UJX4	APC5	3.48	Q92769	HDAC2	2.42	P49593	PPM1F	10.22	Q16563	SYPL1	2
P27695	APEX1	21.7	Q9UBN7	HDAC6	4	Q9Y570	PPME1	9.93	P47897	SYQ	81.25
Q9B2Z5	APIS	28.84	Q8WUJ4	HDAC7	1.95	P53041	PPPS	1.61	P54136	SYRC	55.72
P07741	APT	4.15	Q724V5	HDGR2	10.74	Q00743	PPP6	7.06	Q5T160	SYRM	4.46
Q60306	AQR	8.81	Q9HOR4	HDHD2	4.23	Q6NYC8	PPR18	5.67	P49591	SYSC	1.54
Q15041	AR6P1	7.29	Q9BXW7	HDH5	2.9	P50897	PPT1	1.49	P26639	SYTC	48.55
P13098	ARAF	3.25	Q6A108	HEAT6	4.81	Q60828	PPBP1	2.67	Q9BW92	SYTM	2.02
Q96P48	ARAP1	13.35	P36551	HEM6	15.91	Q5VTL8	PR3B8	3.2	P26640	SYVC	63.27
Q8WWN8	ARAP3	5.89	Q5GLZ8	HERC4	7.34	Q75400	PR40A	6.81	P23381	SYWC	17.27
Q92747	ARC1A	6.11	A2PYH4	HFM1	1.36	Q60831	PRAF2	1.85	P54577	SYYC	6.89
Q15143	ARC1B	30.6	Q9BTY7	HGH1	2	Q75915	PRAF3	4.55	Q9Y224	SYYM	12.65
P61204	ARF3	1.33	Q14964	HGS	14.56	Q43663	PRC1	5.87	Q9NXG1	T161A	2
P18085	ARF4	27.64	Q00291	HIP1	2.05	P48634	PRC2A	5.53	P29084	T2EB	3.89
P84085	ARF5	4.19	Q75146	HIP1R	10.39	Q9Y520	PRC2C	10.94	P35269	T2FA	12
Q8N6H7	ARFG2	5.19	Q8TC19	HM13	8.8	Q13162	PRDX4	13.3	P13984	T2FB	21.68
Q9NP61	ARFG3	2.86	P52926	HMG2	2.17	Q9HCUS	PREB	2.68	Q6P1K8	T2HL	1.43
Q92888	ARHG1	25.67	P09429	HMG81	26.27	Q8TCU6	PREX1	16.32	Q15750	TAB1	3.66
Q92974	ARHG2	21.95	P26583	HMG82	33.21	P49642	PR11	2.75	Q75410	TACC1	2.41
Q14155	ARHG7	2.05	Q15347	HMG83	9.32	P49643	PR12	7.51	Q13148	TADBP	11.41
Q15013	ARHGA	4.2	P05204	HMGN2	6.7	Q75569	PRKRA	12.57	Q01995	TAGL	3.16
Q9NZN5	ARHGC	2.62	Q14979	HNRDL	8.15	P35080	PROF2	2.06	P37802	TAGL2	23.31
Q9Y4X5	ARI1	2.01	P31943	HNRH1	37.55	Q92620	PRP16	12.2	Q96BW9	TAM41	2.66
P40616	ARL1	8.67	P55795	HNRH2	6.77	Q9UMS4	PRP19	37.79	Q9HCD6	TANC2	4.14
Q8IUJ7	ARMC8	2.01	P31942	HNRH3	3.13	Q8WWY3	PRP31	4.19	Q9H2K8	TAKO3	2.1
Q5T2E6	ARMOD3	2.04	Q9BUJ2	HNRL1	27.28	Q43172	PRP4	15.82	Q03518	TAQ1	2.49
Q9H993	ARMT1	10.41	Q1KMD3	HNRL2	8.5	Q94906	PRP6	33.57	Q9H2D6	TARA	2.82
P61158	ARP3	43.56	P07910	HNRPC	18.56	Q6P209	PRP8	90.31	Q9C0C2	TB182	42.44
Q9BPX5	ARPSL	1.49	Q14103	HNRPD	27.57	Q43395	PRPF3	4.9	Q9B0E3	TBA1C	8
Q15144	ARPC2	32.67	P52597	HNRPF	20.74	P62333	PRS10	30.22	Q13748	TBA3C	2.04
Q15145	ARPC3	9.49	P14866	HNRPL	6.61	P62191	PRS4	33.14	P68366	TBA4A	10
P59998	ARPC4	14.73	P52272	HNRPM	76.52	P17980	PRSGA	31.6	Q13885	TBB2A	2.4
Q15511	ARPC5	2.87	Q60506	HNRPQ	62.21	P43686	PRSG8	39.91	Q9BVA1	TBB2B	9.26
P49407	ARRB1	2.09	Q43390	HNRPR	29.39	P35998	PRS7	28.47	Q13509	TBB3	13.96
Q9ULH1	ASAP1	8.16	Q00839	HNRPU	61.17	P62195	PRS8	29.28	Q9NVG8	TBC13	4.48
Q95671	ASML	2.3	Q9NSC5	HOME3	2	Q86WR7	PRSR2	2.02	Q8TC07	TBC15	26.29
P08243	ASNS	25.12	Q5S535	HP1B3	20.85	P55786	PSA	62.66	Q9HA65	TBC17	1.9
Q12797	ASPH	37.49	Q9NZL4	HPBP1	5.72	P25788	PSA3	3.62	Q9MUY8	TBC23	4.88

P54709	AT1B3	1,44	Q9NWX4	HPF1	2,02	P28066	PSA5	10,37	Q9ULP9	TBC24	3,41
P20020	AT2B1	15,9	P00492	HPRT	18,93	P49721	PSB2	2,03	Q66K14	TBC9B	6,89
P24539	AT5F1	5,84	Q9UPZ3	HPSS	2	O75832	PSD10	4,56	Q9BTW9	TBCD	26,58
Q9NW17	ATD3A	8,51	Q92598	HS105	29,99	O00231	PSD11	42,33	Q60343	TBCD4	12,7
Q9NT62	ATG3	4,06	P00MV9	HS71B	9,43	Q9UNM6	PSD13	35,42	Q92609	TBCD5	11,8
Q9Y4P1	ATG4B	4,45	Q0VDF9	HSP7E	6,38	O00487	PSDE	12,43	Q9BYX2	TBD2A	4,88
O95352	ATG7	13,78	O43464	HTRA2	1,45	O75475	PSIP1	23,17	Q9UPU7	TBD2B	4,01
Q723C6	ATG9A	2,01	Q72627	HUWE1	113,5	Q99460	PSMD1	12,8	P23258	TBG1	23,62
Q6DD88	ATLA3	43,52	P19367	HXX1	70,09	Q13200	PSMD2	84,55	Q9UHD2	TBK1	4,12
Q13315	ATM	2,15	P52789	HXX2	25,97	O43242	PSMD3	47,3	Q9BZK7	TBL1R	9,93
O75947	ATPSH	1,72	Q9Y4L1	HYOU1	4,53	P55036	PSMD4	13,28	Q9Y4P3	TBL2	13,53
P56134	ATPK	4	Q8WUF5	IASPP	8,58	Q16401	PSMD5	28,68	Q12788	TBL3	3,96
Q9UBB4	ATX10	7	P20810	ICAL	4	Q15008	PSMD6	14,03	Q16650	TBR1	2
Q8WWM7	ATX2L	21,27	P54105	ICLN	2,01	P51665	PSMD7	5,12	P23193	TCEA1	2,38
O14965	AURKA	5,33	O60725	ICMT	2,63	P48556	PSMD8	8,75	Q13428	TCOF	1,41
Q96GD4	AURKB	1,59	O43837	IDH3B	5,39	O00233	PSMD9	7,38	P53999	TCPC	14,25
Q9NQS1	AVEN	1,7	O75874	IDHC	5,96	Q9UL46	PSME2	10	P17987	TCPC	52,04
Q9NXR7	BABA2	1,73	Q16666	IF16	38,38	P61289	PSME3	8,45	P50991	TCPD	52,34
O00154	BACH	9,29	P20042	IF2B	43,09	Q92530	PSMF1	10,58	P48643	TCPE	38,94
O95816	BAG2	2,13	Q9NZ18	IF2B1	8,79	O95456	PSMG1	3,2	P49368	TCPG	61,86
P46379	BAG6	1,84	Q9Y6M1	IF2B2	37,38	Q8WXF1	PSPC1	6,09	P50990	TCPO	13,39
Q9UQ88	BATP2	2,04	O00425	IF2B3	10,23	O95758	PTBP3	2,04	O14776	TCRG1	12,62
Q92560	BAP1	2	O60841	IF2P	83,92	Q8N4Q0	PTGR3	2,44	P13693	TCIP	2,11
P51572	BAP31	5,51	Q14240	IF4A2	3,22	Q86Y79	PTH	2,03	Q8NHU6	TDRO7	3,16
P56945	BCAR1	3,41	P38919	IF4A3	17,23	Q9Y3E5	PTH2	2,04	Q15185	TEBP	5,67
O75815	BCAR3	1,36	P23588	IF4B	3,7	P18031	PTN1	12,76	Q9NZ01	TECR	9,05
Q9P287	BCCP1	2,01	P06730	IF4E	6,18	Q06124	PTN11	5,26	Q9Y4R8	TELO2	15,18
Q9NYF8	BCLF1	7	Q04637	IF4G1	81,77	Q05209	PTN12	29,33	P55072	TERA	14,6
P55957	BID	2	P78344	IF4G2	57,27	Q9H3S7	PTN23	11,8	Q9UGI8	TES	3,12
Q9Y6D6	BIG1	15,13	O43432	IF4G3	6,58	P43378	PTN9	2,63	Q9NXF1	TEX10	6,53
Q9Y6D5	BIG2	6,76	P55010	IF5	8,25	Q8WUK0	PTPM1	1,83	Q5JUR7	TEX30	2
Q5TH69	BIG3	2,01	Q13325	IFIT5	7,47	P48651	PTSS1	3,06	Q00403	TF2B	1,6
Q14137	BOP1	3,8	Q12894	IFR02	2	Q9UHX1	PUF60	13,83	Q92759	TF2H4	2,22
P46736	BRCC3	2,05	P78318	IGBP1	2,18	Q14671	PUM1	8,02	Q9UKN8	TF3C4	5,52
O60885	BRD4	2,83	P01861	IGHG4	4,51	Q06203	PUR1	3,3	Q9Y5Q8	TF3C5	2,19
P20290	BTF3	15,72	Q70UQ0	IKIP	3,59	P22102	PUR2	56,75	Q04206	TF65	10,39
O60566	BUB1B	1,98	P30740	ILEU	8,84	O15067	PUR4	26,19	Q00059	TFAM	3,95
O43684	BUB3	17,87	Q12905	ILF2	30,61	P22234	PUR6	10,12	Q9H5Q4	TFB2M	1,61
O43709	BUD23	3,48	Q12906	ILF3	47,46	P30566	PUR8	30,5	Q92734	TFG	13,15
Q13895	BYST	9,78	Q13418	ILK	35,23	Q00577	PURA	13,92	P48307	TFPI2	4,22
Q07021	CIQBP	2,01	A11070	ILVBL	10,08	P30520	PURA2	22,61	P02786	TFR1	45,5
O6UB35	CITM	15,36	P52292	IMA1	38,48	Q96QR8	PURB	1,38	O43294	TGF11	8,4
Q6P1N0	CD1A	8,82	O00629	IMA3	6,25	Q92626	PXDN	4,08	P21980	TGM2	59,76
Q13112	CAF1B	2,65	O00505	IMA4	16,34	Q72744	PXK	4,47	Q6YHU6	THADA	6,88
Q05682	CALD1	35,48	P52294	IMA5	14,2	Q9BRP8	PYM1	4	P05543	THBG	1,43
Q9NZT1	CALL5	6,31	O60684	IMA7	32,19	P27708	PYR1	101,1	P24752	THIL	18,19
O43852	CALU	13,35	Q14974	IMB1	34,96	P17812	PYRG1	39,16	P42765	THIM	5,75
P07384	CAN1	52,95	P12268	IMDH2	13,46	P20742	PZP	2,01	Q8NI27	THOC2	22,61
Q9Y6W3	CAN7	2,71	Q9GZP8	IMUP	4,01	P22695	QCR2	3,47	Q96101	THOC3	1,76
Q86VP6	CAND1	80,05	Q27381	INF2	28,92	Q96PU8	QKI	4,16	Q86V81	THOC4	16,9
Q14444	CAPR1	31,65	P49441	INPP	2,36	O27AL8	QRIC1	7,01	Q86W42	THOC6	3,89
P47756	CAPZB	12,93	Q8N201	INT1	2,38	Q9H974	QTRT2	3,32	P00734	THRB	4
Q86X55	CARM1	10,34	Q5TA45	INT11	2,01	Q59G2	R39L5	2	Q9NXG2	THUM1	3,83
P42574	CASP3	3,65	Q68E01	INT3	4,54	P61026	RAB10	2,01	Q9BV44	THUM3	3,39
Q14790	CASP8	7,45	Q9NV88	INT9	2,01	P51153	RAB13	5,75	Q9P016	THYN1	2,88
P07858	CATB	22,85	Q9UI26	IP011	10,88	Q13637	RAB32	2,99	Q13263	TIF1B	26,61
P53634	CATC	3,05	Q8TEX9	IP04	22,33	Q9BZG1	RAB34	3,47	O43615	TIM44	20,45
Q9UBR2	CATZ	3,95	O00410	IP05	18,05	P20337	RAB3B	9,28	Q3ZCQ8	TIM50	5,78
Q03135	CAV1	2,05	Q95373	IP07	26,59	P20339	RAB5A	3,7	Q5JT00	TIAP1	3,73
Q6NZ12	CAVN1	10,51	Q96P70	IP09	22,49	P51148	RAB5C	9,41	P29401	TKT	7,27
P52907	CAZA1	8,26	Q86V13	IQGA3	4,56	Q92930	RAB8B	3,52	Q9BVC6	TM109	2,77
P47755	CAZA2	13,51	O43187	IRAK2	1,78	Q3YEC7	RABL6	5,08	Q7L0Y3	TM10C	11,54
P22681	CBL	10,98	Q14653	IRF3	3,1	P63000	RAC1	4,77	Q9HC07	TM165	2,77
P35520	CBS	3,81	P05161	ISGL5	7,38	Q92878	RAD50	20,04	Q6NUQ4	TM214	12,83
Q9BRT8	CBWD1	2,01	P26006	ITA3	24,97	P35241	RADI	3,26	Q8WUH6	TM263	3,43
Q96C17	CI124	8,28	P08648	ITAS	13	P04049	RAF1	1,6	Q92544	TM954	1,7
Q8N163	CCAR2	16,24	P05556	ITB1	26,78	P46060	RAGP1	40,8	Q96EY4	TMA16	7,5
O60826	CDC22	19,81	P18084	ITB5	7,64	Q9P0K7	RAI14	10,86	Q9ULS5	TMC33	2,04
Q96A33	CDC47	9,24	Q96J02	ITCH	76,8	Q9UKM9	RALY	15,32	Q9UM00	TMC01	4,74
Q8IVM0	CDC50	2	P19823	ITIH2	1,4	P62826	RAN	6,03	P57088	TMM33	9,49
Q567U6	CDC93	3,03	Q14624	ITIH4	1,46	Q96559	RANB9	1,7	Q9BTV4	TMM43	5,55
Q9Y3X0	CDC9	2,13	Q14573	ITPR3	3,98	Q70E73	RAPH1	2,36	Q9NYL9	TMOD3	2,09
P14635	CNBN1	3,52	P26440	IVD	2,48	P20936	RASA1	17,16	Q6ZXV5	TMT33	2,6
P51946	CNH	2	P23458	JAK1	3,47	Q15283	RASA2	4,7	Q96J17	TMX3	6,17
Q6YHK3	CD109	2,99	O60271	JIP4	2,72	Q8IY67	RAVR1	2,06	Q92973	TNP01	12,14
Q9UQ88	CD11A	4,63	P05412	JUN	3,77	P06400	RB	3	Q9Y5L0	TNP03	6,16
O75794	CD123	4,25	P05783	K1C18	61,74	Q8IXT5	RB12B	2,03	Q5JTV8	TOIP1	6,04

Q9Y5K6	CD2AP	3,87	P05787	K2C8	73,77	P51159	RB27A	2,04	O60784	TOM1	2
P48960	CD97	2,63	O6K866	K2C80	2,03	Q15042	RB3GP	3,27	Q15785	TOM34	8,36
Q13042	CD16	1,97	P27144	KAD4	13,16	Q81UD2	RB6I2	3,68	O94826	TOM70	2,99
Q12834	CD20	8,34	O9Y6K8	KAD5	11,98	Q09028	RBBP4	4,04	P11387	TOP1	43,48
Q9UJX2	CD23	2,11	O632Y3	KANK2	16,81	Q16576	RBBP7	15,11	O96K85	TOPK	2,26
P30260	CD27	4,19	P10644	KAP0	12,32	Q9Y3P9	RBGPI	1,53	Q9NXH8	TOR4A	4,79
P60953	CD42	2	P13861	KAP2	10,46	Q9H2M9	RBGPR	2,42	Q7Z392	TPC11	1,62
Q99459	CD5L	29,61	P17612	KAPCA	16,87	P98175	RBM10	4,38	O14773	TPP1	4,35
O6P1J9	CD73	8,22	P48729	KCIA	14,39	Q9NTZ6	RBM12	5,26	P29144	TPP2	13,09
Q9H5V8	CDPC1	9,34	P49674	KCIE	10,34	Q96PK6	RBM14	19,79	Q8IU80	TPPC5	8,71
P06493	CDK1	34,99	Q13557	KCC2D	7,46	Q96T37	RBM15	8,39	Q9Y2L5	TPPC8	2,11
P24941	CDK2	13,16	O96CQ2	KCD12	1,77	P49756	RBM25	12,72	P12270	TPR	3,1
Q00535	CDK5	2	Q9P0J7	KCMF1	4	Q9P2N5	RBM27	2,39	Q9ULW0	TPX2	5,89
Q00534	CDK6	3,57	P30085	KCY	12,49	P98179	RBM3	8,84	Q9Y2W1	TR150	12,8
P50750	CDK9	1,83	Q7LBC6	KDM3B	2,59	Q14498	RBM39	14,54	P62995	TRA2B	5,59
O95674	CD52	1,49	O07666	KHDR1	14,99	Q9BWF3	RBM4	3,59	Q12933	TRAF2	4,14
Q55W79	CE170	18,4	P46013	KI67	3,52	Q9Y580	RBM7	1,72	Q15629	TRAM1	3,53
Q53E24	CEP55	2,48	P52732	KIF11	10,84	P29558	RBM51	4,52	Q12931	TRAP1	32,92
Q9Y6A4	CEA20	2,62	Q9MS87	KIF15	1,81	P38159	RBMX	19,87	Q14258	TR125	42,47
Q9BR16	CGO50	1,46	O43896	KIF1C	3,38	P49792	RBP2	25,83	Q13049	TR132	3,24
Q9H7E9	CH033	3,56	Q02241	KIF23	11,56	Q92804	RBP56	5,02	O75962	TRIO	9,82
Q86WJ1	CHD1L	2,03	O00139	KIF2A	14,13	Q93062	RBPMS	2,11	Q15654	TRIP6	2,96
Q14839	CHD4	29,56	O99661	KIF2C	24,21	P18754	RCCI	4,01	Q14669	TRIPC	3,46
Q99653	CHP1	2	Q9Y496	KIF3A	2,33	Q15293	RCN1	10,34	Q9NXH9	TRM1	5,26
O76071	CIA01	2,8	O95239	KIF4A	12,52	Q14257	RCN2	2,47	Q7Z275	TRM1L	3,16
Q8TCG1	CIP2A	7,98	O60282	KIF5C	5,43	Q8TC12	RDH11	1,6	Q32P41	TRM5	2,01
Q14011	CIRBP	2,02	Q92845	KIFA3	3,35	P46063	RECQ1	57,64	Q9UJAS	TRM6	7,65
Q8N5K1	CISD2	2,88	O9BW19	KIFC1	12,86	Q13123	RED	4,38	Q96FX7	TRM61	2,93
Q07065	CKAP4	63,58	P33176	KINH	82,62	Q9P260	RELCH	6,05	Q9UET6	TRM7	2
Q14008	CKAP5	75,77	Q8TB09	KISHA	2	Q9BZ17	REN3B	2,38	Q9UBP6	TRMB	2
Q72460	CLAP1	17,71	P04183	KITH	11,94	Q92900	RENT1	62,53	Q96011	TRMT1	2,42
O75122	CLAP2	3,57	O07866	KLC1	28,02	Q9HAU5	RENT2	9,14	Q86TN4	TRPT1	3,61
Q9Y240	CLC11	4,37	Q9H0B6	KLC2	7,43	Q96D71	REPS1	2,96	Q9Y4A5	TRRAP	3,4
P09496	CLCA	8,2	P50748	KNTC1	5,81	O15258	REPI	5,36	Q16881	TRXR1	7,99
O14967	CLGN	2,1	P17252	KPCA	7,88	Q6NUM9	RETS1	5,98	Q99816	TS101	10,48
O00299	CLIC1	2,1	O05655	KPCD	6,45	P35244	RF3A	1,82	P07996	TSP1	3,82
Q9Y696	CLIC4	21,19	Q15139	KPCD1	2,01	P35251	RF1C	8,54	P30536	TSP0	2,02
O75153	CLU	13,19	P41743	KPCI	2,09	P35250	RF2C	6,67	O2NL82	TSR1	33,06
P09543	CN37	20,45	O14558	KPRA	24,39	P40938	RF3C	9,72	Q6PFX3	TTC27	7,39
P62633	CNBP	3,15	O60256	KPRB	8,56	P35249	RF4C	10,19	Q6PGP7	TTC37	13,74
Q15021	CND1	48,62	Q13601	KRR1	3,39	P40937	RF5C	18,61	O43156	TTI1	5,59
Q15003	CND2	19,56	Q15418	KS6A1	1,75	Q9BXF6	RFIP5	4,18	Q6NXX4	TTI2	3,67
Q9BPX3	CND3	19,32	P51812	KS6A3	8,94	Q14699	RFNT1	6,95	P33981	TTK	4,66
P42695	CND3D	8,26	O75676	KS6A4	7,57	Q9H0H5	RGAP1	10,93	Q6IB50	TWF2	4,56
O8XG12	CNDG2	2,69	O86UP2	KTN1	13,2	Q07960	RHG01	7,59	P40222	TXLNA	5,27
Q96KP4	CNDP2	4,6	Q15334	L2GL1	4,56	Q68EM7	RHG17	11,8	Q8NB59	TXND5	6,47
Q99439	CNN2	15,53	Q9HPH8	L2HDH	3,69	Q8N392	RHG18	5,67	Q14530	TXND9	3,25
Q15417	CNN3	23,78	P05455	LA	11,35	Q52LW3	RHG29	33,22	P53007	TXTP	1,39
Q9H9A5	CNO10	1,62	O15230	LAMA5	2,11	P84095	RHOQ	2,28	P19971	TYPH	6,84
Q9UKJ21	CNO11	3,85	Q13751	LAMB3	4,24	Q9NPQ8	RIC8A	33,83	Q01081	U2AF1	9,17
ASYKK6	CNOT1	42,86	P42166	LAP2A	50,89	Q6R327	RICTR	2,45	P26368	U2AF2	11,34
Q9NZN8	CNOT2	2,07	P42167	LAP2B	5,25	Q13671	RIN1	7,8	Q43818	U3IP2	4,14
Q9UJIV1	CNOT7	2	Q92615	LAR4B	11,86	Q99496	RING2	1,68	O75643	US20	85,69
Q92600	CNOT9	13,2	O6PKG0	LARP1	36,66	P13489	RINI	43,41	Q15029	USS1	14,53
P78357	CNTP1	7,33	Q71RC2	LARP4	2,01	Q6Z517	RIPR1	9,56	Q3KQV9	UAP1L	2,86
P02452	CO1A1	1,6	Q14847	LASP1	6,35	P23921	RIR1	1,41	P61077	UB2D3	5,51
P0C0L4	CO4A	5,09	Q14739	LBR	4,55	P31350	RIR2	10,41	O14933	UB2L6	1,73
P01031	CO5	3,26	Q9Y383	LC7L2	4,44	P27635	RL10	24,01	Q8TBC4	UBA3	17,59
P02748	CO9	1,5	O95232	LC7L3	4,86	P62906	RL10A	26,63	Q5TF62	UBAP2	8,96
Q99715	COCA1	12,16	Q9UIQ6	LCAP	2,01	P62913	RL11	17,11	P61081	UBC12	10,72
Q9Y281	COF2	3,6	P09382	LEG1	6,99	P30050	RL12	16,19	Q9C0C9	UBE20	5,15
Q9UP83	COG5	3,11	Q8WVC0	LEO1	2,7	P26373	RL13	28,52	Q9H832	UBE22	8,4
P38432	COIL	1,54	O95202	LETM1	4,34	P40429	RL13A	25,52	O05086	UBE3A	6,62
O86X83	COMD2	1,44	Q08380	LG3BP	5,37	P50914	RL14	10,58	Q14139	UBE4A	2,83
Q9UB11	COMD3	6,31	Q9UHB6	LIMA1	4,32	P61313	RL15	18,86	O95155	UBE4B	5,88
Q9H0A8	COMD4	4,8	Q9UPQ0	LIMC1	11,95	P18621	RL17	17,52	P17480	UBF1	13,1
Q9NX08	COMD8	2	Q9UGP4	LIMD1	3,5	Q07020	RL18	18,24	Q14694	UBP10	25,31
Q9P000	COMD9	2,93	P48059	LIMS1	9,64	Q02543	RL18A	23,96	P54578	UBP14	4,53
P21964	COMT	8,23	Q13136	LIPA1	5,25	O76021	RL1D1	5,13	Q9Y5T5	UBP16	1,4
P53621	COPA	119,3	Q86W92	LIPB1	10,42	P46778	RL21	13,23	Q9UUP5	UBP24	7,52
P35606	COPB2	48,95	P43034	LIS1	5,11	P35268	RL22	14,12	Q14157	UBP2L	17,46
P48444	COPD	30,69	P09960	LKHA4	23,95	P62829	RL23	11,82	Q9Y614	UBF3	1,76
O14579	COPE	22	O96L50	LLR1	1,8	P83731	RL24	12,62	P45974	UBP5	16,77
Q9Y678	COPG1	74,16	P49257	LMAN1	14,6	P61254	RL26	22,98	Q93009	UBP7	8,72
Q9UBF2	COPG2	7,41	Q9BU23	LMF2	13,01	Q9UNX3	RL26L	3,66	Q8IWU7	UBR1	2,32
P61923	COPZ1	12,16	P02545	LMNA	45,84	P61353	RL27	20,49	Q5T457	UBR4	114,9
Q9ULV4	COR1C	2,29	P20700	LMNB1	9,2	P46776	RL27A	13,46	O95071	UBR5	3,94

P57737	CORO7	10,07	Q9C0E8	LNP	1,72	P46779	RL28	21,36	Q8TF42	UBS3B	5,11
P24468	COT2	4,26	P36776	LONM	19,71	P47914	RL29	7,97	Q04323	UBXN1	4,83
P00403	COX2	1,44	Q14693	LPIN1	2,01	P39023	RL3	55,35	Q9Y5K5	UCHL5	2,64
Q72332	CP062	1,77	Q9BQK8	LPIN3	4,73	P62888	RL30	17,35	Q9B2X2	UCK2	1,61
Q99829	CPNE1	11,54	Q93052	LPP	2,06	P62899	RL31	15,83	Q9NWZ5	UCKL1	2,09
P04632	CPNS1	11,82	P42704	LPPRC	73,4	P62910	RL32	14,76	Q5JXB2	UE2NL	4,39
Q9P210	CPSF2	2,03	Q60711	LPXN	2,63	P49207	RL34	8,32	Q92890	UFD1	1,47
Q9UKF6	CPSF3	2	P50851	LRBA	2,89	P42766	RL35	8,39	Q94874	UFL1	3,06
Q43809	CPSF5	28,19	Q9H9A6	LRC40	22,11	P18077	RL35A	9,76	Q60701	UGDH	42,93
Q16630	CPSF6	12,83	Q8N1G4	LRC47	26,1	Q9Y3U8	RL36	8,57	Q9NYU2	UGGG1	8,68
Q8N684	CPSF7	21,1	Q96AG4	LRC59	42,73	Q969Q0	RL36L	10,41	Q16851	UGPA	22,56
P50416	CPT1A	6,2	Q8IW76	LRC8A	5,21	P61513	RL37A	2,32	Q96PU4	UHRF2	2,08
Q5TA50	CPTP	1,44	Q96I18	LRCH3	2,13	P63173	RL38	8,72	Q13564	ULA1	28
P52943	CRIP2	6,53	Q07954	LRP1	3,25	P46777	RL5	29,45	P11172	UMPS	10,42
Q9B230	CRNL1	2,01	Q9Y608	LRPF2	2,71	Q02878	RL6	39,68	Q9H3U1	UN45A	31,83
P02741	CRP	1,41	Q6UWE0	LRSM1	2,02	P18124	RL7	43,07	Q60763	USO1	22,21
Q75718	CRTP	6,99	Q9UFC0	LRWD1	2,09	P62917	RL8	23,8	Q93008	USP9X	7,84
Q75534	CSDE1	14,73	Q8ND56	LS14A	1,98	P05386	RLA1	4,86	P46939	UTRO	3,77
P68400	CSK21	18,48	Q3MH22	LSM12	2,03	P05387	RLA2	6,27	Q08AM6	VAC14	25,76
P19784	CSK22	11,95	Q94822	LTN1	10,29	Q9NX20	RM16	2,03	P51809	VAMP7	1,34
P67870	CSK2B	7,29	Q86V48	LUPZ1	29,92	P49406	RM19	2,49	Q9P0L0	VAPA	8
Q13098	CSN1	6,38	Q9NX58	LYAR	6,12	Q722W9	RM21	2	P50552	VASP	9,92
Q9B178	CSN4	7,41	P28300	LYOX	6,32	Q13084	RM28	2,23	P21283	VATC1	6,14
Q92905	CSN5	2,84	Q95372	LYPA2	3,28	Q960V4	RM38	3,12	P36543	VATE1	4,1
Q7LSN1	CSN6	3,77	Q5VW22	LYPL1	1,33	Q9H9J2	RM44	2,57	Q9U112	VATH	7,11
P21291	CSR1P	3,03	Q86UE4	LYRIC	43,7	Q9HD33	RM47	2,01	P52735	VAV2	14,37
Q05048	CSTF1	2,71	Q9NYL2	M3K20	9,17	Q13405	RM49	2	Q96JH7	VICP1	5,75
Q12996	CSTF3	2,02	Q95819	M4K4	46,94	Q63HN8	RM213	28,93	Q00341	VIGLN	79,7
Q96C57	CSTOS	2,8	Q9UKM7	MA1B1	2	Q60518	RNB66	2,63	P18206	VINC	68,21
Q13363	CTBP1	11,68	Q16706	MA2A1	2,04	Q9BQ52	RNZ2	3,35	Q43314	VIP2	2,04
P35221	CTNA1	9,77	Q3K0U3	MA7D1	4,46	P19474	RO52	37,6	Q69YN4	VIR	2,88
P35222	CTNB1	21,31	Q9UPN3	MACF1	57,19	P10155	RO60	9,8	Q9BQ86	VKOR1	2
Q60716	CTND1	40,31	Q15479	MAGB2	7,88	Q13151	ROA0	15,02	Q8N0U8	VKORL	2
Q9UB17	CTNL1	4,51	Q60732	MAGC1	3,3	P09651	ROA1	37,52	Q75436	VP26A	13,15
Q6PD62	CTR9	1,72	Q9UBF1	MAGC2	2	P51991	ROA3	30,21	Q4G0F5	VP26B	2,44
Q14578	CTRO	12,52	Q9UNF1	MAGD2	35,84	Q99729	ROAA	9,18	Q96AK1	VP33A	3,68
Q13616	CUL1	4,05	Q9H0U3	MAGT1	3,39	Q13464	ROCK1	5,28	Q9H267	VP33B	5,29
Q13617	CUL2	12,86	Q98XY0	MAK16	4,95	Q15446	RPA34	2,98	Q9H269	VP516	3,09
Q13618	CUL3	2,44	Q9UDY8	MALT1	4,07	P19388	RPAB1	2	Q9UBQ0	VP529	10,27
Q13619	CUL4A	3,44	P53582	MAP11	2,51	Q9BWH6	RPAP1	7,65	Q96OK1	VP535	47,18
Q13620	CUL4B	17,57	P46821	MAP1B	127,8	P30876	RPB2	8,26	Q75351	VP54B	12,79
Q93034	CUL5	6,75	Q66K74	MAP1S	26,32	P19387	RPB3	2,01	Q9UID3	VP551	9,38
Q9HCG8	CWC22	2,89	P27816	MAP4	49,03	P04843	RPN1	49,66	Q8N1B4	VP552	2,05
Q9HB71	CYBP	7,13	Q7KZ17	MARK2	5,52	P04844	RPN2	34,43	Q5VIR6	VP553	2,46
Q7L576	CYFP1	85,08	P43243	MATR3	45,19	Q95707	RPP29	2,01	Q8N3P4	VP58	2,46
Q43739	CYH3	2,05	Q72434	MAVS	4,13	P78346	RPP30	5,87	Q99986	VRK1	7,33
Q00622	CYR61	9,99	Q9BQ60	MBB1A	45,86	Q9NQ65	RPR1B	2,04	P04004	VTNC	2,75
Q86Y56	DAAF5	3,84	Q9UBB5	MBD2	2,07	Q8N122	RPTOR	5,19	Q641Q2	WAC2A	6,8
Q43293	DAPK3	3,56	Q9NR56	MBNL1	5,41	Q7L523	RRAGA	6,29	Q725K2	WAPL	3,94
Q96EP5	DAZP1	5,53	Q96N66	MBOA7	7,89	Q9HB90	RRAGC	7,2	Q9Y3C0	WASC3	2,01
Q9Y6G9	DC1L1	15,69	Q43324	MCA3	6,43	P62070	RRAS2	4,16	Q2M389	WASC4	17,35
Q43237	DC1L2	24,21	Q96RQ3	MCCA	3,13	Q9P2E9	RRBP1	97,07	Q12768	WASC5	29,32
P61962	DCAF7	2,02	Q43148	MCES	4,07	P56182	RRP1	4,1	Q92558	WASF1	1,81
P27707	DKC	7,62	P49736	MCM2	37,09	Q5JTH9	RRP12	5,73	Q9Y6W5	WASF2	13,6
Q9BTE7	DCNL5	1,69	P25205	MCM3	42,15	Q9Y2L1	RRP44	14,92	A8MWW3	WASH4	1,55
Q14203	DCTN1	22,81	P33991	MCM4	35,04	P46783	RS10	19,2	Q9Y2W2	WBP11	8,9
Q13561	DCTN2	8,48	P33992	MCM5	28,27	P62280	RS11	24,17	Q75717	WDHD1	8,59
Q9UJW0	DCTN4	1,89	Q14566	MCM6	27,08	P25398	RS12	15,34	Q9BZH6	WDR11	4,47
Q9NUJ7	DD19A	6,78	P33993	MCM7	52,82	P62277	RS13	22,45	Q9HTD7	WDR26	1,42
Q16531	DOB1	5,13	Q9BTE3	MCMBP	2,46	P62841	RS15	7,64	Q9UNX4	WDR3	4,07
Q92499	DDX1	37,45	Q75448	MED24	1,51	P62244	RS15A	21,38	Q8N136	WDR36	5,23
Q92841	DDX17	32,68	Q14680	MELK	1,63	P62249	RS16	21,49	P61964	WDR5	3,04
Q9NV1P	DDX18	19,5	Q9Y316	MEMO1	2,51	P08708	RS17	21,92	Q9H6Y2	WDR55	1,89
Q9UH16	DDX20	3,37	Q9BQ41	MEP50	2,25	P62269	RS18	28,76	Q9GZ53	WDR61	4,01
Q9NR30	DDX21	9,54	Q7L210	MEPCE	1,75	P60866	RS20	8,54	Q6UXN9	WDR82	7,44
Q9BUQ8	DDX23	12,78	Q99707	METH	4,18	P63220	RS21	2,04	Q5T9L3	WLS	5,63
Q9GZR7	DDX24	8,73	P31153	METK2	13,64	P62847	RS24	8,26	Q14980	XP01	64,1
Q96G07	DDX27	10,2	Q14728	MFS10	2,02	P62854	RS26	9,96	P55060	XP02	98,25
Q00571	DDX3X	73,15	P10620	MGST1	2	P42677	RS27	4,41	Q9HAV4	XP05	10,99
Q9UJY9	DDX41	1,64	Q94851	MICA2	20,75	P62273	RS29	4	Q96QJ8	XP06	2,04
Q8QXP3	DDX42	7,06	Q16539	MK14	3,13	P23396	RS3	52,11	Q9UIA9	XP07	5,47
Q7L014	DDX46	22,91	Q9BYG3	MKG71	2,58	P62861	RS30	1,45	Q43592	XPOT	35,41
Q9H0S4	DDX47	13,13	P19105	ML12A	21,77	P46782	RS5	29,9	Q9NQW7	XPP1	8,17
P17844	DDX5	60,69	Q8NB16	MLKL	1,94	P62081	RS7	29,97	P13010	XRCC5	79,74
Q9BQ39	DDX50	2	P03956	MMP1	9,51	P62241	RS8	32,03	P12956	XRCC6	51,82
Q9Y2R4	DDX52	7,72	P50281	MMP14	8,17	P46781	RS9	31,38	Q8IZH2	XRN1	2,21
P26196	DDX6	26,32	Q96716	MMS19	31,43	P63162	RSMN	3,79	Q9H0D6	XRN2	15,43

Q5H9U9	DDX6L	2,04	Q9UBU8	M04L1	20,79	P08865	RSSA	23,39	P67809	YBOX1	30,37
Q16698	DECR	4,08	Q15014	M04L2	6,51	Q15404	RSU1	14,8	P16989	YBOX3	6,45
P35659	DEK	24,32	Q9H859	MOB1A	7,19	Q9Y399	RT02	3,17	Q95070	YIF1A	2,13
Q43583	DENR	1,42	Q96007	MOC2B	4	Q9Y2R9	RT07	1,94	Q58JH7	YIF1B	2,01
Q9Y315	DEOC	3,78	P26038	MOES	30,94	P82933	RT09	2,86	Q969M3	YIPF5	1,77
Q98UN8	DERL1	4	Q13724	MOGS	7,53	P82650	RT22	4,9	Q9Y5A9	YTHD2	1,44
P60981	DEST	7,88	Q7Z3U7	MON2	10,46	Q9Y3D9	RT23	3,62	Q75152	ZC11A	1,76
Q00273	DFFA	1,82	P53985	MOT1	2,47	Q92552	RT27	5,71	Q8WU90	ZC3HF	26,2
Q53GQ0	DHB12	19,67	Q15427	MOT4	6,37	P51398	RT29	3,92	Q7Z2W4	ZCCHV	13,44
P51659	DHB4	24,11	Q9HCE1	MOV10	10,66	P82930	RT34	8,67	P31629	ZEP2	2,01
Q15392	DHC24	4,73	P36507	MP2K2	9,35	Q00442	RTCA	9,74	Q96MM3	ZFP42	2,57
Q00796	DHS0	15,98	P46734	MP2K3	2,87	Q9Y310	RTCB	22,77	Q9Y6X8	ZHX2	1,49
Q43143	DHX15	49,68	Q00325	MPCP	21,59	Q9NZ71	RTFL1	1,7	Q43670	ZN207	5,27
Q60231	DHX16	20,24	Q8N3R9	MPP5	2	Q92541	RTF1	9,09	Q86UK7	ZN598	3,39
Q7Z478	DHX29	13,81	Q10713	MPPA	4	Q95197	RTN3	1,71	Q96953	ZN622	2,1
Q7L2E3	DHX30	11,76	Q6WCQ1	MPRI	4,12	Q9NQC3	RTN4	9,8	Q9P2E3	ZNFX1	5,29
Q9H2U1	DHX36	6,65	Q5V725	MRCKA	1,76	Q9Y224	RTAF	19,1	Q8NEV0	ZNT7	3,73
Q81Y37	DHX37	3,46	Q9Y552	MRCBK	8,65	P08621	RUI7	12,12	Q07157	Z01	25,12
Q6P158	DHX57	2,95	P49959	MRE11	21,65	P09661	RU2A	14,03	Q9UDY2	Z02	9,89
Q08211	DHX9	86,8	Q9NV56	MRGBP	2,02	P08579	RUB2B	3,93	Q95218	ZRAB2	5,08
Q60610	DIAP1	63,08	Q8NDA8	MROH1	4,94	Q9Y265	RUBV1	2,48	Q43264	ZW10	10,37
Q9NSV4	DIAP3	4,3	Q15091	MRPP3	2,03	P62304	RUXE	2	Q9H900	ZWILC	1,32
Q68CQ4	DIEXF	2	Q9UKD2	MRT4	11,62	P62306	RUXF	1,92			
Q9P265	DIP2B	4,68	P43246	MSH2	19,51	P06903	S10AA	3,01			
Q9UB54	DJB11	5,92	P52701	MSH6	30,8	P31949	S10AB	3,09			
Q8IXB1	DJC10	11,51	Q94776	MTA2	16,94	Q9Y6Y8	S23IP	2,22			
Q71565	DJC13	30,11	Q95248	MTMR5	2,01	Q6P1M0	S27AA	3,57			
Q5F1R6	DJC21	1,44	Q9Y217	MTMR6	2,3	Q99808	S29A1	2,08			
Q60832	DKC1	10,43	Q8NCE2	MTMRE	4,31	Q92504	S39A7	2,09			
Q15398	DILGP5	5,13	Q9BV20	MTNA	25,12	P61619	S61A1	20,06			
Q9NP97	DLR81	5,37	P42345	MTOR	2,76	Q96ER3	SAAL1	2			
P31689	DNJA1	25,41	P42285	MTREX	29,78	Q9NTJ5	SAC1	2,02			
Q60884	DNJA2	14,45	Q43312	MTSS1	8,1	Q9UBE0	SAE1	8,89			
Q96EY1	DNJA3	5,03	Q96597	MYADM	2,52	Q15424	SAFB1	1,31			
P25685	DNJB1	9,92	Q99836	MYD88	2,34	P23526	SAHH	26,44			
Q9UDY4	DNJB4	3,24	P02144	MYG	1,7	Q43865	SAHH2	7,51			
Q96K68	DNJC1	3,78	P35580	MYH10	81,4	Q5K651	SAMD9	4,65			
Q99615	DNJC7	5,75	P35749	MYH11	2,86	Q9Y3Z3	SAMH1	12,41			
Q8WXK5	DNJC9	9,51	P60660	MYL6	21,36	Q00422	SAP18	1,58			
P49916	DNLI3	4,64	P24844	MYL9	4	Q75446	SAP30	1,35			
Q00429	DNM1L	47,34	Q9HD67	MYO10	2,16	Q15020	SART3	8,35			
Q6XZF7	DNMBP	5,31	Q43795	MYO1B	67,69	Q6UWP8	SBSN	2,05			
P26358	DNMT1	13,72	Q94832	MYO1D	30,63	P67812	SC11A	2,01			
Q9ULAO	DNPEP	13,69	Q12965	MYO1E	59,7	Q15027	SC16A	32,19			
Q43598	DNPH1	1,8	Q9Y411	MYO5A	18,93	Q75396	SC22B	21,45			
Q96B76	DOC10	4,86	Q9UM54	MYO6	25,96	Q15436	SC23A	32,74			
Q8N110	DOCK4	8,7	Q13459	MYO9B	8,94	Q15437	SC23B	3,07			
Q9H7D0	DOCK5	2,56	Q9NZM1	MYOF	28,14	Q95486	SC24A	7,95			
Q96N67	DOCK7	32,05	Q14974	MYPT1	16,04	Q95487	SC24B	5,59			
Q9BZ29	DOCK9	2,5	P41227	NAA10	4,4	P53992	SC24C	24,99			
Q9Y3R5	DOP2	2,03	Q9BX39	NAA15	34,21	Q94979	SC31A	54,24			
Q60762	DPM1	12,03	Q14CX7	NAA25	2,38	P60468	SC618	3,92			
Q14181	DPOA2	2,08	P43490	NAMPT	45,11	Q9UPN6	SCAF8	2,16			
P28340	DP0D1	16,44	P49321	NASP	7,64	Q8WVM8	SCFD1	13,97			
P09884	DPOLA	3,92	Q9H0A0	NAT10	19,22	Q6NUK1	SCMC1	2,07			
Q9UHL4	DPP2	1,4	Q8IVL1	NAV2	2,1	Q8NBX0	SCPD1	5,77			
Q9NY33	DPP3	33,92	A2RRP1	NBAS	3,92	Q14160	SCR1B	8,64			
Q86T12	DPP9	5,18	Q60934	NBN	4,99	Q96KG9	SCYL1	16,73			
Q14195	DPYL3	55,28	Q14919	NC2A	4,45	Q6P3W7	SCYL2	6,04			
Q16643	DREB	10,97	Q01658	NC2B	3,35	Q00560	SDCB1	5,75			
Q9Y295	DRG1	41,34	Q09161	NCBP1	19,95	P55735	SEC13	12,88			
Q8TEA8	DTD1	7,59	Q9UBB6	NCDN	2,97	Q99442	SEC62	5,03			
P51452	DUS3	1,58	Q9Y2A7	NCKP1	63,8	Q9UGP8	SEC63	2,47			
Q14641	DVL2	2,02	Q969V3	NCLN	16,72	Q9NVA2	SEPT11	2,25			
Q00148	DX39A	9,19	Q9Y6Q9	NCOA3	2,07	Q15019	SEPT2	14,6			
P63167	DYL1	3,95	Q9Y618	NCOR2	2,48	Q16181	SEPT7	8,34			
Q7RTS9	DYM	2,16	P16435	NCPR	8,22	Q9UHD8	SEPT9	26,28			
P50570	DYN2	51,6	Q14777	NDC80	4,1	Q43175	SERA	46,7			
Q03001	DYST	11,82	Q9NXR1	NDE1	2,31	Q9Y617	SERC	5,78			
P19525	E2AK2	19,97	P22392	NDRB	2,57	P50454	SERPH	28,01			
Q43491	E41L2	15,77	Q92597	NDRG1	25,93	Q15637	SFO1	13,85			
Q95905	ECD	2	Q9UGV2	NDRG3	10,37	Q15459	SF3A1	7,15			
P40939	ECHA	61,61	Q16795	NDUA9	1,98	Q12874	SF3A3	3,78			
Q5VYK3	ECM29	35,67	Q9P032	NDUF4	1,79	Q75533	SF3B1	63,76			
Q9H8V3	ECT2	2,7	Q9NVZ3	NECP2	2,26	Q13435	SF3B2	40,16			
Q96F86	EDC3	4,02	Q96PU5	NED4L	13,69	Q15393	SF3B3	14,62			
Q6P2E9	EDC4	29,5	P46934	NEDD4	4,54	Q15427	SF3B4	8,37			



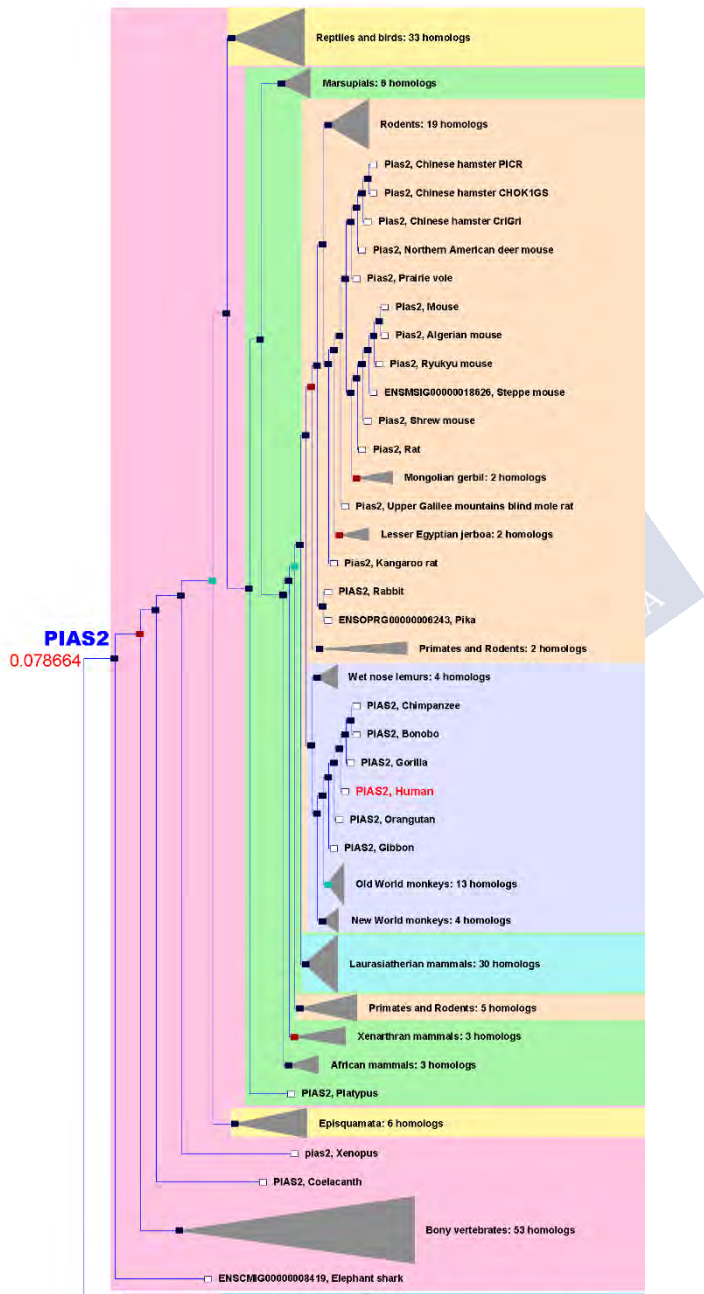
P060869	EDF1	3	Q8TDX7	NEK7	6,25	Q9Y3B4	SF3B6	1,69			
P24534	EF1B	2,43	Q9H3P2	NELFA	5,85	Q5FBB7	SGO1	1,62			
P29692	EF1D	11,87	Q8WX92	NELFB	8,28	Q9Y220	SGT1	10,79			
Q96C19	EFH02	32,54	P18615	NELFE	10,83	Q96B97	SH3K1	2,02			
Q72222	EFL1	16,79	O60524	NEMF	8,66	Q8NEM2	SHCBP	6,23			
Q8N6R0	EFNMT	3,76	Q92979	NEP1	7,16	O15357	SHIP2	2,16			
P00533	EGFR	35,28	Q8NFW8	NEUA	5,54	Q9Y371	SHLB1	2,02			
Q8N3D4	EH1L1	2,13	P21359	NF1	2,49	Q9UHJ6	SHPK	2,03			
Q9H4M9	EHD1	64,01	Q8NCF5	NF2IP	4,04	Q96ST3	SIN3A	3,55			
Q9NZN4	EHD2	12,57	O00712	NFIB	2,09	Q15477	SKIV2	21,93			
Q9H223	EHD4	43,97	P08651	NFIC	1,52	P63208	SKP1	1,95			
Q9UI10	EI2BD	16,74	P19838	NFKB1	1,73	Q08AF3	SLFN5	7,77			
Q13144	EI2BE	6,07	Q00653	NFKB2	4,34	Q9GZT3	SLIRP	1,32			
Q9NR50	EI2BG	6,62	Q96IV0	NGLY1	2,03	Q7Z7L1	SLN11	2,76			
Q9BY44	EIF2A	32,78	Q8NBF2	NHLC2	1,78	P84022	SMAD3	6,72			
Q14152	EIF3A	95,11	Q9BZQ8	NIBAN	27,58	Q9UPU9	SMAG1	1,57			
P55884	EIF3B	43,38	Q96TA1	NIBL1	52,46	Q8IYB5	SMAP1	4,43			
Q99613	EIF3C	52,66	Q96D46	NMD3	3,24	Q14683	SMCIA	16,25			
O15371	EIF3D	39,14	P30419	NMT1	25,88	O95347	SMC2	63,1			
P60228	EIF3E	27,97	O60551	NMT2	4,01	Q9UQE7	SMC3	11,09			
O00303	EIF3F	22,53	P40261	NNMT	15	Q9NTJ3	SMC4	58,18			
O75821	EIF3G	14,74	Q8NCW5	NNRE	1,54	P51532	SMCA4	8,45			
Q13347	EIF3I	22,68	Q9ULX3	NOB1	4,92	O60264	SMCA5	4,21			
O75822	EIF3J	1,68	Q9BVI4	NOC4L	3,18	Q969G3	SMCE1	1,8			
Q9UBQ5	EIF3K	2,45	Q9BZE4	NOG1	8,09	P62314	SMD1	6			
Q9Y262	EIF3L	46,3	Q5SY16	NOL9	3,62	P62316	SMD2	7,69			
Q7L2H7	EIF3M	21,22	Q14978	NOLC1	2,62	P62318	SMD3	4,01			
O15717	ELAV1	13,33	P46087	NOP2	6,87	Q9H0W8	SMG9	3,55			
Q12926	ELAV2	7,37	O00567	NOP56	22,05	A6NHR9	SMHD1	14,68			
Q961J3	ELMO2	5,77	Q9Y2X3	NOP58	12,27	Q92922	SMRC1	2,27			
Q14241	ELOA1	4,08	Q86U38	NOP9	2,68	P53814	SMTN1	2,38			
Q9BW60	ELOV1	3,8	Q9Y314	NOSIP	7,57	Q9HAU4	SMUF2	5,14			
O95163	ELP1	12,22	Q04721	NOTC2	7,88	P54920	SNAA	5,38			
Q9H9T3	ELP3	3,51	P55209	NP1L1	16,32	Q7KZF4	SND1	6,37			
Q32P44	EMAL3	3,18	Q99733	NP1L4	10,14	Q96D17	SNR40	1,44			
Q9HC35	EMAL4	4,98	O60287	NPA1P	2,3	P09012	SNRPA	10,55			
Q8N766	EMC1	16,64	P06748	NPM	22,95	Q13425	SNTB2	4,56			
Q9P0I2	EMC3	1,68	O14786	NRP1	3,47	O43290	SNUT1	11,31			
P50402	EMD	11,02	Q15738	NSDHL	9,62	Q53G59	SNUT2	8,55			
O94919	ENDD1	9,37	P46459	NSF	26,81	Q13573	SNW1	18,38			
Q9HCE0	EPG5	2,3	Q08J23	NSUN2	21,6	Q13596	SNX1	5,34			
P58107	EPIPL	2,34	Q96P11	NSUN5	1,63	Q96L92	SNX27	1,48			
Q7L775	EPMP1	2,09	Q9H857	NTSD2	11,19	Q9UNH7	SNX6	9,86			
Q14677	EPN4	14,19	P57740	NU107	4,15	Q9Y5X2	SNX8	7,68			
P42566	EPS15	14,17	Q8WUM0	NU133	2,47	Q9Y5X1	SNX9	10,78			
Q12929	EPS8	3,16	O75694	NU155	15,86	P35610	SOAT1	2,66			
Q9NZ08	ERAP1	21,82	Q12769	NU160	7,37	O94964	SOGA1	1,7			
Q2NKX8	ERC6L	10,08	Q5SRE5	NU188	16,76	P30626	SORCN	2,33			
P18074	ERCC2	2,06	Q92621	NU205	2,72	Q07889	SOS1	1,44			
P24390	ERD21	2,01	P35658	NU214	6,83	Q9Y589	SP16H	52,3			
P33947	ERD22	3,7	Q9Y5Y2	NUPB2	7,08	Q9BV07	SPA5L	2,7			
P15170	ERF3A	10,09	Q9H1E3	NUCK5	1,77	P35237	SPB6	25,11			
Q969X5	ERGI1	4,03	P19338	NUCL	72,62	P50452	SPB8	13,09			
Q96RQ1	ERGI2	2,13	Q9Y266	NUDC	3,52	Q8NBT2	SPC24	5,92			
P84090	ERH	3,24	Q96RS6	NUDC1	14,39	A1X283	SPD2B	2,78			
O94905	ERLN2	5,5	Q9BZD4	NUF2	4,01	P19623	SPEE	15,09			
Q96HE7	ERO1A	6,19	Q7Z417	NUPF2	11,53	O75934	SPF27	4			
Q9H6S3	ES8L2	4,59	Q14980	NUMA1	4,91	Q9NZQ3	SPN90	3,58			
Q9BSJ8	ESYT1	16,17	Q9Y6R0	NUMBL	1,62	Q9NS26	SPNXA	1,33			
A0FGR8	ESYT2	15,64	Q9UKK7	NUP50	2,18	P49903	SPS1	2,48			
P14921	ETSI	2,65	Q9BVL2	NUP58	4,22	Q9NUQ6	SPS2L	26,77			
Q01844	EWS	11,74	P37198	NUP62	3,34	P52788	SPSY	27,82			
Q9Y2D4	EXC6B	4,48	Q9BW27	NUP85	5,55	Q8TB22	SPT20	1,66			
Q9NV70	EXOC1	6,17	Q99567	NUP88	8,39	Q01082	SPTB2	6,86			
Q96KP1	EXOC2	3,94	Q8N1F7	NUP93	33,76	O15269	SPTC1	12,46			
Q96A65	EXOC4	10,93	P52948	NUP98	3,68	O15270	SPTC2	5,21			
Q9NPD3	EXOS4	7,35	Q9BXS6	NUSAP	3,2	Q13813	SPTN1	11,32			
Q5RKV6	EXOS6	2,02	Q9UBU9	NXF1	6,27	Q9Y6N5	SQOR	36,71			
Q01780	EXOSX	8,53	Q6DKJ4	NXN	3,25	Q13501	SQSTM	11,24			
Q9NZB2	F120A	36,16	Q9Y6K5	OAS3	15,47	O15042	SR140	6,74			
Q96ND0	F210A	2,04	P04181	OAT	4,05	O14247	SRC8	46,07			
Q16875	F263	3,05	Q56VL3	OCAD2	2	P84022	SMAD3	6,72			
Q658Y4	F91A1	6,3	Q01968	OCRL	1,79	Q9UPU9	SMAG1	1,57			
Q9HQ0Q	FA49A	1,7	P10515	ODP2	1,67	Q8IYB5	SMAP1	4,43			
Q9NUQ9	FA49B	10,23	P08559	ODPA	9,06	Q14683	SMCIA	16,25			
P12259	FA5	2,11	P11177	ODPB	11,56	O95347	SMC2	63,1			
Q9H4H8	FA83D	3,21	O60502	OGA	18,57	Q9UQE7	SMC3	11,09			



Q8NCA5	FA98A	11,15	Q9NZT2	OGFR	5,36	Q9NTJ3	SMC4	58,18			
Q52L10	FA98B	4,02	Q15294	OGT1	9,28	P51532	SMCA4	8,45			
Q00519	FAAH1	2	Q9NTK5	OLA1	2,01	Q60264	SMCA5	4,21			
Q01469	FABP5	7,61	Q60313	OPA1	7,04	Q969G3	SMCE1	1,8			
Q98XW9	FACD2	3,7	Q96CV9	OPTN	2,26	P62314	SMD1	6			
Q96GK7	FAH2A	2,48	Q13416	ORC2	3,42	P62316	SMD2	7,69			
Q05397	FAK1	8,96	Q9UBD5	ORC3	6,13	P62318	SMD3	4,01			
Q96920	FAKD4	4,59	Q98XB5	OSB10	6,71	Q9H0W8	SMG9	3,55			
Q7L8L6	FAKD5	3,6	Q9BZF1	OSBL8	10,19	A6NHR9	SMHD1	14,68			
Q9NVI1	FANCI	9,6	Q96SU4	OSBL9	1,45	Q92922	SMRC1	2,27			
P49327	FAS	192,2	Q9NPF4	OSGEP	1,37	P53814	SMTN	2,38			
Q8WUP2	FBL11	2	P39656	OST48	26,69	Q9HAU4	SMUF2	5,14			
P22087	FBRL	21,77	Q9NRP0	OSTC	2	P54920	SNA4	5,38			
Q8NEZ5	FBX22	2,06	Q8N6M0	OTU68	2,32	Q7KZF4	SND1	6,37			
Q9Y3I1	FBX7	5,69	Q96FW1	OTUB1	18,68	Q96D17	SNR40	1,44			
P39748	FEN1	37,68	Q96BN8	OTUL	2,01	P09012	SNRPA	10,55			
Q96AC1	FERM2	29,89	Q00443	P3C2A	4,03	Q13425	SNTB2	4,56			
Q5NUL3	FFAR4	1,34	Q32P28	P3H1	2,62	Q43290	SNUT1	11,31			
P09038	FGF2	1,42	P13674	P4HA1	17,05	Q53G59	SNUT2	8,55			
Q13642	FHL1	5,01	Q15460	P4HA2	11,3	Q13573	SNW1	18,38			
Q14192	FHL2	2,22	Q61N85	P4R3A	3,02	Q13596	SNX1	5,34			
Q9Y613	FHOD1	3,52	P04637	P53	4,55	Q96L92	SNX27	1,48			
Q92562	FIG4	1,59	Q96C36	P5CR2	6,72	Q9UNH7	SNX6	9,86			
Q6UN15	FIP1	4,16	Q8WXI9	P66B	4,08	Q9Y5X2	SNX8	7,68			
Q5T1M5	FKB15	1,48	P27986	P85A	1,42	Q9Y5X1	SNX9	10,78			
Q00688	FKBP3	3,89	P68402	PA1B2	2,01	P35610	SOAT1	2,66			
Q14318	FKBP8	2,03	Q9UQ80	PA2G4	45,56	Q94964	SOGA1	1,7			
Q01543	FLI1	1,71	P11940	PABP1	54	P30626	SORCN	2,33			
Q13045	FLI1	46,28	Q86U42	PABP2	2,44	Q07889	SOS1	1,44			
Q75369	FLNB	168,5	Q13310	PABP4	20,95	Q9Y589	SP16H	52,3			
Q14315	FLNC	219,9	Q6VY07	PACS1	2,09	Q9BWQ7	SPA5L	2,7			
Q8IVF7	FMNL3	8,83	Q8N7H5	PAF1	2,15	P35237	SPB6	25,11			
Q06787	FMR1	2,62				P50452	SPB8	13,09			



Apéndice 2: PIAS2 Gene Tree (Ensembl). Los números representan la distancia genética









**Apéndice 3: Predicción de sitios de SUMOilación covalentes (SUMO) y no de covalentes (SIMs, *SUMO-interaction motifs*) de las Proteínas identificadas en el estudio de proteómica de proteínas asociadas a PIAS2 en mitosis. Se han utilizado los programas de predicción JASSA v4 y GPS-SUMO 1.0.**

UPS, Unused ProtScore; Global FDR 1%; 92,6% confidence: al menos 1 péptido con >95% confianza.

Código de colores:

**Consensus**

**PSDM:** phosphorylation-dependent SUMOylation motif; **NSDM:** negatively charged amino acid-dependent SUMOylation motif; **HCSM:** hydrophobic cluster SUMOylation motif; **SC-SUMO:** synergy control motif; **SUMO ac-Switch:** SUMO acetyl Switch

**Consensus Inverted**

**SIMs and motifs type:**

SIM Type a: [V/I]-[x]-[V/I]-[V/I]; SIM Type β, [V/I]-[V/I]-[x]-[V/I/L]; SIM Type a, [P/I/L/V/M]-[I/L/V/M]-[x]-[I/L/V/M]-[a/s]3; SIM Type b: [P/I/L/V/M/F/Y]-[I/L/V/M]-[D]-[L]-[T]

Proteínas identificadas relacionadas con Mitosis CYTO_Reactome (n=170)		UPS	JASSA v4 (Joined Advanced Sumoylation Site and Sim Analyser): Putatif SUMO sites and Putatif SIMs				GPS-SUMO 1.0 (Prediction of SUMOylation Sites and SUMO-interaction motifs			
Protein Entry	Protein Name		Position K	Sequence	Best Predicted Score and Predicted Score (Predictive Score MAX: 38,183 y Cutoff: 12,812)	Type	Position	Peptide	Threshold	Type
Q9NRG9	AAAS	11.14								
P61163	ACTR1A	15.28	661	ALEGDIFIGPKAEHRGLLSI	High	Putatif SUMO sites HCSM	61	GDIFIGPKAEHRGL	High	Sumoylation
P31749	AKT1	7.51					64	VAQCQLMKTERPRPN	High	Sumoylation
							182	YYAMKILKKEVIKAK	High	Sumoylation
							276	NVVYRDLKLENLMLD	High	Sumoylation
Q9H1A4	ANAPC1	3.55	6275	VHSVWTLRRVKSEENWVLKF	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	151 - 155	SNEVEKICILQSSCINMH	High	SUMO Interaction
			6346	PDTMYLLDFVKPEFLLRLTLA	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	275	VWTLRRVKSEENVV	High	Sumoylation
							739	PSEASQMKDEDFSQN	High	Sumoylation

							853	QWVSSCLKGE MPPY	Hig h	Sumoylat ion
							1272 - 1276	AHRHTAE VLLAE JGRPPGP	Hig h	SUMO Interacti on
							1400	MYLLDFVKPEFL LLR	Hig h	Sumoylat ion
							1767 - 1771	NMGQKQE ILDLF SSVLYEC	Hig h	SUMO Interacti on
Q9UJX4	<b>ANA PCS</b>	3.48					417 - 421	WKHSLSE LIDIS IAQKTAI	Hig h	SUMO Interacti on
O14965	<b>AUR KA</b>	5.33	<b>K258</b>	HSKRVIHRDIKPEN LLGSAG	High	Putatif SUMO sites Strong Consensu s	258	RVIHRDIKPENL LLG	Hig h	Sumoylat ion
			<b>K271</b>	NLLGSAGELKIAD FGWSVHA	High	Putatif SUMO sites Strong consensu s inv				
			<b>K309</b>	EMIEGRMHDEKVD LWSLGVLC	High	Putatif SUMO sites Strong consensu s inv				
Q96GD 4	<b>AUR KB</b>	1.59	<b>K202</b>	HGKKVIHRDIKPEN LLGLKG	High	Putatif SUMO sites Strong Consensu s	202	KVIHRDIKPENL LLG	Hig h	Sumoylat ion
			<b>K215</b>	ANLLGLKGELKIA DFGWSVH	High	Putatif SUMO sites Strong Consensu s inv	211	ENLLGLKGELK IAD	Hig h	Sumoylat ion
			<b>K287</b>	SHNETYRRIVKVDL KFPASVP	High	Putatif SUMO sites Strong Consensu s				
Q59HH 6	<b>BUB 1B</b>	1.98	<b>K5</b>	----- MAAVKKEGGALSE AM	High	Putatif SUMO sites HCSM	5	***MAAVKKEG GALS	Hig h	Sumoylat ion
			<b>K752</b>	ELCIEDRPMPKLEI EKEIELG	High	Putatif SUMO sites NDSM	362 - 366	PCKIEPS INHIL STRKPGK	Hig h	SUMO Interacti on
			<b>K769</b>	IELGNEDYCIKREY LICEDYK	High	Putatif SUMO sites NDSM	752	IEDRPMPKLEI KEI	Hig h	Sumoylat ion
							769	GNEDYCIKREY LICE	Hig h	Sumoylat ion
							791 - 795	APRNSAE LTVIK VSSQPVP	Hig h	SUMO Interacti on
O43684	<b>BUB 3</b>	17.87	<b>K322</b>	FIRQVTDATPKPS PCT	High	Putatif SUMO sites Strong consensu s inv				



P14635	CCN B1	3.52	K67	QAKMPMKKAPKPS ATGKVIDK	High	Putatif SUMO sites Consensus s inv	63	LQAKMPMKKEA KPSA	Hig h	Sumoylat ion
			K111	PEPEPEPVKEEKL SPEPIL	High	Putatif SUMO sites PDSM	111	EPEPEPVKEEKL SPE	Hig h	Sumoylat ion
			K288	TKHQIRQMEMKIL RALNFGLG	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	120 - 124	EKLSPEP ILVDT ASPSME	Hig h	SUMO Interacti on
							227 - 231	QETMYMT VSIID RFMQNNC	Hig h	SUMO Interacti on
P51946	CCN H	2								
Q13042	CDC 16	1.97					109	RLFELYLKDESG FKD	Hig h	Sumoylat ion
							408 - 412	DPFVME VGIVA FQNGEWK	Hig h	SUMO Interacti on
Q12834	CDC 20	8.34	K125	NLNGFDVEEKILR LSGKPQN	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	216 - 220	WSASSGD ILQLL QMEQPGE	Hig h	SUMO Interacti on
Q9UJX2	CDC 23	2.11	K147	SLGLEKQVKNEA LRELVE	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s	147	PLEKGQVKNEA LREL	Hig h	Sumoylat ion
							313	LLYVRSMKSEL SYLA	Hig h	Sumoylat ion
P30260	CDC 27	4.19	K441	KLDSSIIEGKISTI TPQIQQA	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	284 - 288	PLTPSFG ILPLE TPSPGDG	Hig h	SUMO Interacti on
			AA 307- 310	QNYTNTPPVIDVPS TGAPSK	22.411	SIM Type β				
P06493	CDK 1	34.99								
P24941	CDK 2	13.16								
Q00534	CDK 6	3.57								
Q14008	CKA P5	75.77	K38	EEALKIFQKIKDEK SPEWSKF	High	Putatif SUMO sites Minimal SC-SUMO	8 - 12	MGDDSEW LKLPV DQKCEHK	Hig h	SUMO Interacti on
			K311	ESVEVLINKPKLEA GDYADLV	High	Putatif SUMO sites NDSM	39	LKIFQKIKDEKS PEW	Hig h	Sumoylat ion
			K374	PTILEKFKEKKPV VQALQEA	High	Putatif SUMO sites Consensus s inv	988	EDLSEELKENP FLR	Hig h	Sumoylat ion
			K515	AGLAADKKEFKPLP GRTAASG	High	Putatif SUMO sites Consensus s inv	1151	MPSKTSLKEDK DKSG	Hig h	Sumoylat ion

			K112	EDCISSTSEPKPDP KKAKAPG	High	Putatif SUMO sites Consensus s inv	1173	NGKEQRMKDE KGLKV	High	Sumoylat ion
			K143	SAAPIKQVEEKPOR AQNISSN	High	Putatif SUMO sites Consensus s Inv				
			K152	IFEPVLPEPKIRAV SPHFDD	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv				
			AA 848- 851	EPDDGSNDVWDL PRTEISD	18.358	SIM Type β				
Q9BQT 5	CLA SP1	17.71					1424 - 1428	SIHPEQC IKVLC PIIQTAD	High	SUMO Interacti on
Q9NSZ 2	CLA SP2	3.57	K107	SNHNERVEERKIAL YELMKLT	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	1180 - 1184	SISPEQC IKVLC PIIQTAD	High	SUMO Interacti on
			K125	AVHAVIGDELKPHL SOLTGSK	High	Putatif SUMO sites consensus s inv				
P49674	CSN K1E	10.34	K88	NIASGEEVAIKLECV KTKHPQ	High	Putatif SUMO sites	38	SGEEVAIKLECV KTK	High	Sumoylat ion
			K130	HSKNFIHRDVKPD NFLMGLGK	High	HCSM Putatif SUMO sites Strong Consensus s				
			K375	RAISRVDREKVS MRLHRGAP	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv				
P68400	CSN K2A 1	18.48	K76	ILKPVKKKKIKREIK ILENLR	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	79	PVKKKKIKREIK ILE	High	Sumoylat ion
			K83	VKKKKIKREIKILEN LRGGPN	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	82 - 86	KKKKIKRE IKILE NLRGGPN	High	SUMO Interacti on
P19784	CSN K2A 2	11.95	K80	ILKPVKKKKIKREVK ILENLR	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	80	PVKKKKIKREVK ILE	High	Sumoylat ion
			K84	VKKKKIKREVKILEN LRGGTN	High	Putatif SUMO sites				

						Strong consensus inv				
P67870	<b>CSN K28</b>	7.29								
Q13616	<b>CUL 1</b>	4.05	K664	ENANVDEVELKPDT LIKLYLG	High	Putatif SUMO sites consensus inv	689	VNINWPMKTEQ KQEQ	High	Sumoylation
							753 - 757	VPVIKKC IDILI EKEYLER	High	SUMO Interaction
Q13561	<b>DCT N2</b>	8.48								
Q9Y6G9	<b>DYN C1L I1</b>	15.69					238 - 242	TLTHNLG IPVLV VCTKCDA	High	SUMO Interaction
							344	HENFQTLKAED NFED	High	Sumoylation
O43237	<b>DYN C1L I2</b>	24.21	K275	YGAAIYTSVKEEK NDLLEYK	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	225 - 229	VLTHNLG IPVLV VCTKCDA	High	SUMO Interaction
			K319	FIPAGWDNEKKIAI LHENFTT	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	275	ALIYTSVKEEKN LDL	High	Sumoylation
			K331	AILHENFTTVKPED AYEDFIV	High	Putatif SUMO sites NDSM	331	HENFTTVKPED AYED	High	Sumoylation
P63167	<b>DYN LL1</b>	3.95	K43	NIEKDIAAHIKKEF DKKNYPT	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	43	KDIAAHIKKEFD KKY	High	Sumoylation
P50402	<b>EMD</b>	11.02	K37	VGSTRRLYEKKIFE YETQRRR	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
			K78	RGDADMYDLPKKE DALLYQSK	High	Putatif SUMO sites High consensus				
Q2NXX8	<b>ERC C6L</b>	10.08	K593	RLITCGTVEEKIYR RQVFKDS	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	685	YTCDSLVEKEELD VVE	High	Sumoylation
			K585	DLMYTCDSLVEKEEL DVVEESH	High	Putatif SUMO sites NDSM	853	ETLQEGPKQEA LQED	High	Sumoylation
			K853	VQKETLQEGPKQE ALQEDPLE	High	Putatif SUMO sites NDSM	898 - 902	RHCNPWP IISIT NESQNAE	High	SUMO Interaction
P39748	<b>FEN 1</b>	37.68					224 - 228	GLNQEQF VDLCT LLGSDYC	High	SUMO Interaction

Q08379	GOL GA2	4.29	K577	TSALQSEQHVKREL GKKLGEL	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	311	TQSNEDLKQEK SELE	High	Sumoylation
			K679	SRLAQDKKEMKVK LLELQELV	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	401	DKYAENLKGES AMWR	High	Sumoylation
			K998	FYRADENDEVKITV I-----	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	577	LQSEQHVKREL GKKL	High	Sumoylation
Q9H8Y 8	GOR ASP 2	1.55	K159	LFLIETHEAKPLK YVYNTD	High	Putatif SUMO sites Consensus s inv	176 - 180	DTDNCRE VIITP NSAWGGE	High	SUMO Interacti on
P49841	GSK 3B	8.73	K60	RPQEVSYTDTKVIG NGSFGV	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv				
P57053	H2B FS	11.03	K285	MILKLRMEELKILS DTYTVK	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	205 - 209	KVWKLA EVLVGE QQQCQDA	High	SUMO Interacti on
Q9H6D 7	HAU S4	2.01								
Q724H 7	HAU S6	4.26	K230	PYDDHSNMEEKIQ KVRSLWAS	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	319	NEVLKVMKYER CQAD	High	Sumoylation
			K562	SPQLSEGKEIKLEE LIDSLGS	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	562	LSEGKEIKLEELI DS	High	Sumoylation
			K657	DFGQSHLTEEKVIS DCECPVQ	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	935	LGELPNLKEEDI LNK	High	Sumoylation
Q9B2 5	HAU S8	2	K162	QTLTLTLLSVKMEN NLAEFER	High	Putatif SUMO sites NDSM	162	LLTLLSVKMEN NLAE	High	Sumoylation
Q13547	HDA C1	8.24	K444	SSNFKKAKRVKTED EKEKDPE	High	Putatif SUMO sites NDSM	444	FKKAKRVKTED EKEK	High	Sumoylation
			K469	VTEEEKTKEEKPEA KGVKEEV	High	Putatif SUMO sites Consensus s inv	476	KPEAKGVKEEV LA*	High	Sumoylation

			K476	KEEKPEAKGVKEEV KLA----	High	Putatif SUMO sites  Strong Consensus				
Q02241	KIF 23	11.56	K406	LFKNYFDGEGKVR MIVCVNPK	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus s inv	44 - 48	FPDQECCE IEVIN NTTVQLH	High	SUMO Interacti on
			K416	KVRMIVCVNPKAED YEENLQV	High	Putatif SUMO sites  NDSM	624	MVTETTMKWE KECER	High	Sumoylat ion
			K571	LEKKNKTLEYKIEL EKTTTI	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus s inv	647	MQNKLWVKDE KLKQL	High	Sumoylat ion
			K647	QLEMQNKLWVKDE KLKQLKAI	High	Putatif SUMO sites  Strong Consensus s	662	KAIVTEPKTEK ERP	High	Sumoylat ion
			K662	KQLKAIVTEPKTEK PERPSRE	High	Putatif SUMO sites  High Consensus s	899	FTDIETLKQESP NGS	High	Sumoylat ion
			K732	VASCISEWEQKIPT YNTPLKV	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus s inv				
O00139	KIF 2A	14.13	K670	ATQLEAILEQKIDIL TELSDK	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus s inv				
Q99661	KIF 2C	24.21					275	LNKQELAKKEID VIS	High	Sumoylat ion
P50748	KNT C1	5.81	K197	RLVTELCLEYKIYDL QLWNL	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus s inv	5 - 9	***MWND IELLT NDDTGSG	High	SUMO Interacti on
			AA 899- 902	DDEIYSLRIIDLIDR EQGED	14.85	SIM Type $\beta$	87 - 91	HLVFDTE VDWVG LCQEGKF	High	SUMO Interacti on
							218 - 222	AGDLASE VPVII GGTGNC	High	SUMO Interacti on
							499	YAKTRLLKKED KTAL	High	Sumoylat ion
							900 - 904	EIYSLRI IDLID REQGEDC	High	SUMO Interacti on
P20700	LMN B1	9.2	K528	QNSWGTGEDVKVI LKNQSGEE	High	Putatif SUMO sites	527 - 531	SWGTGED VKVIL KNSQSGEE	High	SUMO Interacti on

						Strong consensus inv				
Q14693	LPI N1	2.01	K365	APLLPMIEELKPPS ASVQTA	High	Putatif SUMO sites Consensus inv	31 - 35	PATLSGC IDIIV IRQPNGN	High	SUMO Interaction
			K565	FSWRGRNTTKEE SKPEQCLA	High	Putatif SUMO sites Minimal SC-SUMO	565	RGRNTTKEES KPEQ	High	Sumoylation
			K569	GRNTTKEESKPEQ CLAGKAH	High	Putatif SUMO sites Consensus inv	595	LSLATRVKHES SSD	High	Sumoylation
			K595	PPQLSLATRVKHES SSSDEER	High	Putatif SUMO sites Extended PDMS				
			K673	GTIYLWNWDDKVI ISDIDGTI	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
			K771	SALHREVIEKKPEK FKVQCLT	High	Putatif SUMO sites Consensus inv				
			K824	SLNRIFTVNPKGEL VQEHAKT	High	Putatif SUMO sites Consensus inv				
Q9BQK8	LPI N3	4.73	K639	ATTIYLWKWDDKW ISDIDGTI	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	33 - 37	TLSGGID VLVVK QVDGSFR	High	SUMO Interaction
			K737	SALHREVIEKKPEV FKVACLS	High	Putatif SUMO sites Consensus inv	351 - 355	KSWSWAT LEVVP PTGQPER	High	SUMO Interaction
Q96GX5	MAS TL	12.08	K322	SVESECHSSPKWE KDCQESDE	High	Putatif SUMO sites NDSM				
P49736	MC M2	37.09	K348	PFCQSQNQEVKPG SCPECQSA	High	Putatif SUMO sites consensus inv				
			K450	LANHVAKKDNKVA VGELTDED	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
P25205	MC M3	42.15								
P33991	MC M4	35.04								

P33992	MC M5	28.27	K521	LSRFDMIFIVKDEHNEERDVM	High	Putatif SUMO sites NDSM	517 - 521	ILSRFDM IFIVKDEHNEER	High	SUMO Interaction
							521	FDIFIVKDEHNEER	High	Sumoylation
Q14566	MC M6	27.08					552 - 556	DYAIARRIVDLH SRIEESI	High	SUMO Interaction
P33993	MC M7	52.82	K174	RGIVTRVSEVKPKMWATYTC	High	Putatif SUMO sites Consensus inv				
Q15021	NCA PD2	48.62	K616	EESRGNDLVKQEMLVQYLQD	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	31 - 35	NQYVQVEVLSIKHLPPQLR	High	SUMO Interaction
			K746	LCEFVKQDELKPAVTQLLWER	High	Putatif SUMO sites Consensus inv	616	RGNDELVKQEMLVQY	High	Sumoylation
							638 - 642	SRKITEA IGIISKMMYENT	High	SUMO Interaction
P42695	NCA PD3	8.26	AA 961-964	EDVAVRNNVIVMCDLCIRY	14.009	SIM Type a				
Q9BPX3	NCA PG	19.32	K496	RKKELKMAEIKVKLIEAKEAL	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	406 - 410	EFIGQQL ILIIKSLDTSEE	High	SUMO Interaction
							522	FNRASELKEEIKALE	High	Sumoylation
Q86X12	NCA PG2	2.69	K221	LECFININIKKEEGRRFLSC	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	61 - 65	LKNLLTDVLLES PVDGWQV	High	SUMO Interaction
			K796	RVQIHDTRPVKPELALVYIEY	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	221	FININIKKEEGRRF	High	Sumoylation
			K841	HLQHKFCSEGVYLSMLEDTG	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	541 - 545	EWWCERCVTLVQMNHAAAR	High	SUMO Interaction
			K857	LEDTGFWLESKILSFIQDQEE	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	756	IHDTRPVKPEALVY	High	Sumoylation
			AA 123-126	NYEALLECVIIINGI LYALP	23.869	SIM Type β				
Q15003	NCA PH	19.56	K122	STCIKLSTENKITTKNAFGLH	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	725	LANEKNLKLEGTEDL	High	Sumoylation



Q14777	<b>NDC 80</b>	4.1	<b>K33</b>	LSINKPTSERKVSL FGKRTSG	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	346	ELECETIKQENT RLQ	High	Sumoylat ion
			<b>K346</b>	ARVELECETIKQEN TRLQNI	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	504	KRSVRTLKEEV QKLD	High	Sumoylat ion
Q9NXR 1	<b>NDE 1</b>	2.31					170	LESVQRLLKDEA RDLR	High	Sumoylat ion
Q8TDX 7	<b>NEK 7</b>	6.25	<b>K39</b>	NTLANFRIEKKIGR GQFSEVY	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv				
Q9Y26 6	<b>NUD C</b>	3.52	<b>K227</b>	IIDGELYNEVKVEES SWLIED	High	Putatif SUMO sites Extended PDSM	227	GELYNEVKVEES SWL	High	Sumoylat ion
			<b>K239</b>	EESWLIEDGKVV T VHLEKIN	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv				
Q9BZD 4	<b>NUF 2</b>	4.01	<b>K31</b>	LTKNDLYPNPKPEV LHMIYMR	High	Putatif SUMO sites Consensus s	41	NDLYPNPKPEV LHMI	High	Sumoylat ion
			<b>K348</b>	ENSFKRLMIVKKEK LATAQFK	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	165	AHQEALMKLER LDSV	High	Sumoylat ion
							335	ESELKKLKEEN SFK	High	Sumoylat ion
							348	FKRLMIVKKEKL ATA	High	Sumoylat ion
Q14980	<b>NU MA1</b>	4.91	<b>K122</b>	SPRDWEQFEYKIQ AELAVILK	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	37 - 41	LQDCSIF IKIID RIHGTEE	High	SUMO Interacti on
			<b>K117</b>	AAGRTEPTGPKLEA LRAEVSK	High	Putatif SUMO sites Consensus s	303	LKQCQDLKTEK SQMD	High	Sumoylat ion
			<b>K176</b>	ASPISQLPPKVES LESLYFT	High	Putatif SUMO sites HCSM	419	VLQLETLKQEA TLA	High	Sumoylat ion
							740	QRCISELKAETR SLV	High	Sumoylat ion
							839	QEQLMTLKEEC EKAR	High	Sumoylat ion
							1766	ISQRLPPKVESL ESL	High	Sumoylat ion
P57740	<b>NUP 107</b>	4.15								
Q8WU M0	<b>NUP 133</b>	2.47	<b>K518</b>	TKNETIAQEDKIKL LKA AFLQ	High	Putatif SUMO sites	352 - 356	LKQNC DG LVILA AAWHSAD	High	SUMO Interacti on

						Strong consensus inv				
							1070	DININDLKLEILCKA	High	Sumoylation
075694	NUP 155	15.86	K468	SWALSAIDELKVDKIITPLNK	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus inv	345 - 349	VFKPIVQ IAVIE NSESLDC	High	SUMO Interaction
							552 - 556	DQACATC LILAC STAACDR	High	SUMO Interaction
							1329 - 1333	HLLDCIH VLLIR YVENPSQ	High	SUMO Interaction
Q12769	NUP 160	7.37	K331	VADMLEYVPVKDLRLTAGTG	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	495	DLSWSELKKEVTLAV	High	Sumoylation
			AA 151-154	YVSETQNRVILMLTNQTVH	23.869	SIM Type $\beta$	1175 - 1179	AAPTNRQ IEILE LEDLEKE	High	SUMO Interaction
			AA 1038 - 1041	QLDCLRQLWVLCERSQLQD	13.196	SIM Type $\beta$				
Q5SRE5	NUP 188	16.76	K122	FITVLQMKEMKVS DIPQYSQL	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	608 - 612	TTVISPP VDVIA SCVNCLT	High	SUMO Interaction
			AA 568-571	QHCQRVKPIIDLHV KVISTD	14.851	SIM Type $\beta$	1171	LILLRQWKRELGSVD	High	Sumoylation
							1456 - 1460	ADHTVGF ILQLS NFMKEWH	High	SUMO Interaction
							1684	PRDKQRMKQELSEL	High	Sumoylation
Q92621	NUP 205	2.72					628 - 632	HPQWTPV WILG LLQCSIP	High	SUMO Interaction
							643	CSIPPVLKAELLKTL	High	Sumoylation
							1901 - 1905	SFIIETC LFILWRHLEYL	High	SUMO Interaction
P35658	NUP 214	6.83	K227	VQYLPTLQEKVIP CPPFYES	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	1538	PQTSDSVKKEPVLAQ	High	Sumoylation
			K278	SPDVWMLLPKKEEKHPEIFV	High	Putatif SUMO sites HCSM				
			K806	HLLYKRPLDPKSEA QLQEIRR	High	Putatif SUMO sites Consensus				
			K151	QAPPQTSDSVKKEPVLAQPAV	High	Putatif SUMO sites SUMO-Ac switch				

			K194	GFASSSFGEQKPT GTFSSGGG	High	Putatif SUMO sites Consensus s inv				
Q9UKX 7	NUP 50	2.18	K110	FASAKAAADPKVAF GSLAANG	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	347 - 351	ENDEPPK VVVTE VKEEDAF	High	SUMO Interacti on
			K353	EPPKVVTEVKEED AFYSKKC	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	353	KVVTEVKEEDA FYS	High	Sumoylat ion
P37198	NUP 62	3.34	K383	TSLHREVEKVKLDQ KRLDQEL	High	Putatif SUMO sites NDSM	383	HREVEKVKLDQ KRLD	High	Sumoylat ion
Q9BW2 7	NUP 85	5.55								
Q99567	NUP 88	8.39	AA 211- 214	REPQTPTNVIILSE AEEESL	23.869	SIM Type β	449 - 453	STEQKCF VEHIL CTKPLPC	High	SUMO Interacti on
							519 - 523	VEVAESP LRVLA ETPDSFE	High	SUMO Interacti on
							584	ILKQDLAKEIQ RRV	High	Sumoylat ion
							662	SDSERDMKKEL QLIP	High	Sumoylat ion
							719	KCIQSILKEEGE HIR	High	Sumoylat ion
Q8N1F 7	NUP 93	33.76					103	TDIQGFLKNEK DNAL	High	Sumoylat ion
Q96CV9	OPT N	2.26	K373	LQVESMLSEIKME QAKTEDEK	High	Putatif SUMO sites NDSM	108	SHENEKLKEELG KLK	High	Sumoylat ion
							373	ESMLSEIKMEQ AKTE	High	Sumoylat ion
Q13416	ORC 2	3.42					36	REGGAKLKKEK AQLL	High	Sumoylat ion
							335 - 339	TTMLQDS IHVVI NGFFPGI	High	SUMO Interacti on
							418 - 422	QLSSLHN IYLIA SIDHLNA	High	SUMO Interacti on
Q9UG4 4	ORC 3	6.13					55	QLIWQQMKSE NERLQ	High	Sumoylat ion
							215 - 219	SQWQSP VVIL KDMESFA	High	SUMO Interacti on
							395	LTNERYLKEETQ LLL	High	Sumoylat ion
							611	NNPYYYLKNEA LKSE	High	Sumoylat ion
							616	YLNKNEALKSEEG CIP	High	Sumoylat ion
P43034	PAF AH1 B1	5.11								
P12004	PCN A	28.22	K240	SADVPLVVEYKIAD MGHLKYY	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	254	LKYYLAPKIEDE EGS	High	Sumoylat ion
			K254	MGHLKYYLAPKIED EES---	High	Putatif SUMO sites				

						HCSM				
Q29RF7	PDS 5A	14.98	K693	LLQCLRMEDDKVA EAAIQIFR	High	Putatif SUMO sites  Strong consensu s inv				
			K125 6	AENIQQKTDEKVD ESGPPAPS	High	Putatif SUMO sites  Strong consensu s inv				
			K127 1	PSKPRRRRRPKSE SQGNATKN	High	Putatif SUMO sites  Consensu s				
Q9NTI5	PDS 5B	4.62	K683	LLACLKMDDEKVAE AALQIFK	High	Putatif SUMO sites  Strong consensu s inv	1303	PLGGGTPKEEP TMKT	Hig h	Sumoylat ion
			K124 1	DDLTKLVQEQKPK GSQRSRKR	High	Putatif SUMO sites  Consensu s inv				
			K136 1	PPKPLGGGTPKEEP TMKTSKK	High	Putatif SUMO sites  SUMO-Ac switch				
Q8WV2 4	PHL DA1	2.01								
075928	PIA S2	2.28	K389	AALYLQMNEKKPT WICPVC DK	High	Putatif SUMO sites  Consensu s inv				
			K436	EDGSWCPMRPKKE AMKVSSQP	High	Putatif SUMO sites  Consensu s				
			AA 469- 473	EASKKKVDVIDLTI ESSSDE	38.183	SIM Type b				
P53350	PLK 1	5.02	K191	NLFLNEDLEVKIGD FGLATKV	High	Putatif SUMO sites  Strong consensu s inv				
P09884	POL A1	3.92	K284	DKESEPAEEVKQEA DSGKGT V	High	Putatif SUMO sites  Extended PDSM	284	SEPAEEVKQEA DSGK	Hig h	Sumoylat ion
			K395	RTLYFLPREMKIDL NTGKETG	High	Putatif SUMO sites  Strong consensu s inv	469	PQLPQDLKGET FSHV	Hig h	Sumoylat ion
			K608	FKEVIEKKNVKVEV AATERTL	High	Putatif SUMO sites	608	VIEKKNVKVEVA ATE	Hig h	Sumoylat ion

						Strong Consensus				
			K948	AYAGGLVDPKVG YDKFILL	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	628	FFLAKVHKIDPD IIV	High	Sumoylation
			K102	EEVFKLGKVKSEV NKLYKLL	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	717	ELVQQLKTERV VIP	High	Sumoylation
							1026	FKLGKVKSEV NKLY	High	Sumoylation
							1216 - 1220	QYYLAQQ IHPWV ARICEPI	High	SUMO Interaction
Q14181	POL A2	2.08					93 - 97	GHAGARD IVSIQ ELIEVEE	High	SUMO Interaction
P28340	POL D1	16.44	K447	QSKQTGRDRTKV SMVGRVQM	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	574	GLLMPVVKSEG GEDY	High	Sumoylation
			K574	MHEGLMPVKSE GGEDYTGA	High	Putatif SUMO sites NDSM	938	KGVAAYMKSED PLFV	High	Sumoylation
P62136	PP1 A	34.57					330	RNSAKAKK****	High	Sumoylation
P62140	PP1 B	4.94								
Q9Y570	PPM E1	9.93	K119	ALDLRSHGETKVN PEDLSAE	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	150 - 154	YGDLPPI IMLIG HSMGGA	High	SUMO Interaction
P62140	PPP 1CB	4.94								
P36873	PPP 1CC	3.09					323	MITKQAKK****	High	Sumoylation
							37	KRQKTKVKFDD GAVF	High	Sumoylation
							424	TATKISPKEER KDE	High	Sumoylation
							1015	KADNQRLKDEN GALI	High	Sumoylation
							1030	RVISKLSK****	High	Sumoylation
P67775	PPP 2CA	23.06	K4	----- MDEKVTKELDQW I	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
P30153	PPP 2R1 A	36.39	K163	VCYPRVSSAVKAEL RQYFRNL	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	163	PRVSSAVKAEL RQYF	High	Sumoylation
			K202	FAKVLLEDNVKSEII PMFSNL	High	Putatif SUMO sites Minimal SC-SUMO	202	VLELDNVKSEII PMF	High	Sumoylation

			K561	LDNSTLQSEVKPIL EKLTDQDQ	High	Putatif SUMO sites Consensus s inv	374	PLFLAQLKDECP EVR	Hig h	Sumoylat ion
							451 - 455	NSLCMAW LVDHV YAIREEA	Hig h	SUMO Interacti on
							505 - 509	RMTTLFC INVLS EVCQDQI	Hig h	SUMO Interacti on
P63151	PPP 2R2 A	14.81	K62	WIFQEQENKIQS HSRGEYN	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	137	RPEGYNLKEED GRYR	Hig h	Sumoylat ion
			K95	DYLSLEIEEKINKI RWLPQK	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv				
Q13362	PPP 2R5 C	2.13	K244	GFALPKEEHKIFLL KVLLPL	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	25 - 29	SNGPFQP VLLH IRDVPPA	Hig h	SUMO Interacti on
			K432	KMKEREEAWWKIE NLAKANPQ	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	240	NGFALPKEEHK IFL	Hig h	Sumoylat ion
			K476	EDVQMLRKTVDKDE AHQAQKDP	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	432	EREEAWWKIEN LAKA	Hig h	Sumoylat ion
							476	QMLRKTVDKDEA HQAQ	Hig h	Sumoylat ion
Q14738	PPP 2R5 D	22.49	K82	IKYSGGPQIVKKER RQSSSRF	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	6	**MPYKLKKEK EPPK	Hig h	Sumoylat ion
			K565	TEAVQMLKDIKKEK VLLRRKS	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	82	SGGPQIVKKER RQSS	Hig h	Sumoylat ion
							316	NGFALPKEEHK MFL	Hig h	Sumoylat ion
							563	VQMLKDIKKEK VLLR	Hig h	Sumoylat ion
Q16537	PPP 2R5 E	3.19					257	NGFALPLKAEH KQFL	Hig h	Sumoylat ion
P49642	PRI M1	2.75					216 - 220	HPFTRKS INIHK KYFEYA	Hig h	SUMO Interacti on
P49643	PRI M2	7.51	K462	QRILNGGKDIKKEP IQPETPQ	High	Putatif SUMO sites SC-SUMO	276 - 280	GKISLDQ IDLLS TKSFPPC	Hig h	SUMO Interacti on
							328	EQALQFWKQEF IKGK	Hig h	Sumoylat ion
							462	LNGGKDIKKEPI QPE	Hig h	Sumoylat ion

P17612	PRK ACA	16.87	K106	LQAVNPFVLVKLEF SFKDNSN	High	Putatif SUMO sites HCSM	106	VNFPFLVKLEFS FKD	Hig h	Sumoylat ion
							169	DLIYRLKPENL LID	Hig h	Sumoylat ion
P17252	PRK CA	7.88	K205	YVKLKLIPDPKNES KQKTKIT	High	Putatif SUMO sites Consensu s	165	KRGRIYLKAEVA DEK	Hig h	Sumoylat ion
P25788	PSM A3	3.62					245	KYAKESLKEEDE SDD	Hig h	Sumoylat ion
P28066	PSM A5	10.37								
P49721	PSM B2	2.03								
P62191	PSM C1	33.14	K326	LDGFSRSGDVKVI MATNRIET	High	Putatif SUMO sites Strong consensu s inv	64	QCRLKLLKLERI KDY	Hig h	Sumoylat ion
							175	DPLVTVMKVEK APQE	Hig h	Sumoylat ion
P35998	PSM C2	28.47	K169	PTVTMMQVEEKPD VTYSDVGG	High	Putatif SUMO sites Consensu s inv	122 - 126	VKQFAKF VDLS DQVAPTD	Hig h	SUMO Interacti on
			AA 122- 125	NVKQFAKFWDLSD QVAPTD	SIM Type β	18.358				
P17980	PSM C3	31.6	K53	QRTRLDSEIKIMK SEVLRT	High	Putatif SUMO sites Strong consensu s inv	56	DSEIKIMKSEVL RVT	Hig h	Sumoylat ion
							96 - 100	LVSNIIE LLDVD PNDQEED	Hig h	SUMO Interacti on
							326 - 330	GFQPNQ VKVIA ATNRVDI	Hig h	SUMO Interacti on
P43686	PSM C4	39.91	K62	EFLEVQEEYIKDEQ KNLKKEF	High	Putatif SUMO sites Strong Consensu	4 - 8	****MEE IGILV EKAQDEI	Hig h	SUMO Interacti on
							62	EVQEEYIKDEQ KNLK	Hig h	Sumoylat ion
							69	KDEQKNLKKEF LHAQ	Hig h	Sumoylat ion
P62195	PSM C5	29.28					406	MSIKKLWK****	Hig h	Sumoylat ion
P62333	PSM C6	30.22								
Q99460	PSM D1	12.8	K124	ENADLPEGEKKPID QRLEGIV	High	Putatif SUMO sites Consensu s inv	761 - 765	HTHMPSV VGVLV FTQFWFW	Hig h	SUMO Interacti on
			K238	AVSDILEKLKVEDN LLMAYQI	High	Putatif SUMO sites Strong Consensu s	911 - 915	KPLSIGG IIIIK DTSEDIE	Hig h	SUMO Interacti on
			K934	LVEPVAAHGPKIEE EEQEPEP	High	Putatif SUMO sites NDSM	934	PVAAHGPKIEEE EQE	Hig h	Sumoylat ion



075832	PSM D10	4.56	K124	ENADLPEGEKKPID QRLEGIV	High	Putatif SUMO sites Consensus s inv	761 - 765	HTHMPSV VGVLV FTQFWFW	Hig h	SUMO Interacti on
			K238	AVSDILEKLVKEDN LLMAYQI	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	911 - 915	KPLSIGG IIIIK DTSEDIE	Hig h	SUMO Interacti on
			K934	LVEPVAAHGPKIEE EEQEPEP	High	Putatif SUMO sites NDSM	934	PVAAHGPKIEEE EQE	Hig h	Sumoylat ion
000231	PSM D11	42.33	K32	ASIDILHSIVKROI QENDEEA	High	Putatif SUMO sites NDSM	24 - 28	STDREAS IDILH SIVKROI	Hig h	SUMO Interacti on
Q96112	PSM D2	84.55	K343	LARELDIMEPKVPD DIYKTHL	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	612 - 616	NVLKVQQ LLHIC SEHFDSK	Hig h	SUMO Interacti on
043242	PSM D3	47.3					2	*****MKQEG SARR	Hig h	Sumoylat ion
							38	APQDVEMKEEA ATGG	Hig h	Sumoylat ion
P55036	PSM D4	13.28					49 - 53	RSNPENN VGLIT LANDCEV	Hig h	SUMO Interacti on
							132	VKLAKRLKKEKV NVD	Hig h	Sumoylat ion
							138 - 142	LKKEKVN VDIIN FGEEEVN	Hig h	SUMO Interacti on
Q16401	PSM D5	28.68	K358	HQSKNAPVELKIRC LDAISSL	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv				
P51665	PSM D7	5.12	K316	KDKDKESDVKKE EKKEK--	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	316	DKEKSDVKKEE KKEK	Hig h	Sumoylat ion
P48556	PSM D8	8.75					99	TGMYEQLKGE WNRKS	Hig h	Sumoylat ion
							260 - 264	AESYFFF IDILL DTIRDEI	Hig h	SUMO Interacti on
000233	PSM D9	7.38	K189	IGSWQHSEGKPLN VTVIRRG	High	Putatif SUMO sites Consensus s inv				
Q9UL4 6	PSM E2	10	K108	EKVLSSLALVKPEV WTLKEKC	High	Putatif SUMO sites Extended PDSM	108	LSLLALVKPEVW TLK	Hig h	Sumoylat ion
			K131	VITWIQHLIPKIED GNDFGVA	High	Putatif SUMO sites HCSM	119 - 123	WTLKEKC ILVIT WIQHLIP	Hig h	SUMO Interacti on
			K231	SSNLEKIVNPKGEE KPSMY--	High	Putatif SUMO sites	131	WIQHLIPKIED GNDF	Hig h	Sumoylat ion

						Consensus				
			K235	EKIVNPKGEEKPSM Y-----	High	Putatif SUMO sites Consensus s inv	231	LEKIVNPKGEEK PSM	High	Sumoylat ion
P61289	PSM E3	8.45	K123	QQLVDIIIEKVKPEI RLIEKC	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	115 - 119	MLKSNQQ LVDII EKVKPEI	High	SUMO Interacti on
							123	VDIIIEKVKPEIRL LI	High	Sumoylat ion
Q92530	PSM F1	10.58					4 - 8	****MAG LEVLF ASAAPAI	High	SUMO Interacti on
P49792	RAN BP2	25.83	K335	QVPRPKIKLIKGEA GQNLLEM	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	335	RPKIKLIKGEAG QNL	High	Sumoylat ion
			K322	KMICQQVEAIKKE MQELKLS	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus s	683 - 687	SVWSYWN LALIF HRKAEDI	High	SUMO Interacti on
			K127	HALDYADELPKPEQ LAIRFKT	High	Putatif SUMO sites Consensus s	822	CQQVEAIKKEM QELK	High	Sumoylat ion
			K141	VQDRFALVTPKKEG HWDCSIC	High	Putatif SUMO sites Consensus s	1414	RFALVTPKKEG HWDK	High	Sumoylat ion
			K203	VELVTGEEDEKVL SQRVKLF	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	2064	LGNLKILKNEVN GKL	High	Sumoylat ion
			K241	TACDFADGERKVE HLAVRFKL	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	2632 - 2636	DSPSDDD VLIVY ELTPAE	High	SUMO Interacti on
			K257	SSVAQSSESKEVP KKCELSK	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv	2711 - 2715	ADNEKEC IIVWE KKPTVEE	High	SUMO Interacti on
			K259	NSDIEQSDDSKVK NLFASFPT	High	Putatif SUMO sites Strong consensus s inv				
			K271	EKECIIVWEKKPTV EEKAKAD	High	Putatif SUMO sites consensus s inv				

			K283 E	DTDSTSQGESKIVS FGGSST	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus s inv				
			K295 I	NHVITKTMELKPLN VSNNALV	High	Putatif SUMO sites  consensus s inv				
			K301 E	TASDYADGEAKVE QLAVRFKT	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus s inv				
P46060	RAN GAP 1	40.8	K528	VHMGLLKSEDVKV AIANLYGP	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus s inv	481	LKVSSVFKDEAT VRM	High	Sumoylat ion
							524	LVMGLLKSED KVKA	High	Sumoylat ion
P06400	RB1	3	K537	DFYKVIESIFIKAEG NLTREMI	High	Putatif SUMO sites  Strong Consensus s	462	RVMESMLKSEE ERLS	High	Sumoylat ion
			K245	VQETFKRVLKEEE YDSIIVF	High	Putatif SUMO sites  HCSM	537	KVIESIFIKAEGN LTR	High	Sumoylat ion
							745	TFKRVLKEEY DSI	High	Sumoylat ion
Q09028	RBB P4	4.04	K22	VEERVINEEYKIWK KNTPLY	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus s inv				
			K120	SVSGKIEIEIKINHE GEVNRA	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus s inv				
			K215	WDISAVPKEGKV DAKTIFTG	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus s inv				
P35251	RFC 1	8.54	K44	LKAKKGIKEIKVNS SRKEDDF	High	Putatif SUMO sites  Strong consensus s inv	348	KENAIKLKGETK TPK	High	Sumoylat ion
			K543	SKRDSLAKTIKKET DVFWKS	High	Putatif SUMO sites  Strong Consensus s	498	IAVETEMKKESK LER	High	Sumoylat ion
			K589	RNLADDSSSENKVE NLLWVDKY	High	Putatif SUMO sites	543	DSLAKTIKKETD VFW	High	Sumoylat ion

						Strong consensus inv				
			K105	KPSPFSLDPKVKAFTRAYN	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
P35250	RFC 2	6.67	K44	LKAKKGIKEIKVNSRKEDDF	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	348	KENAIKLKGETKTPK	High	Sumoylation
			K543	SKRDSLAKTIKKETDVFWKSL	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	498	IAVETEMKKESKLER	High	Sumoylation
			K580	RNLADSSSENKVENLLWVDKY	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	543	DSLAKTIKKETDVFW	High	Sumoylation
			K105	KPSPFSLDPKVKAFTRAYN	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
P40938	RFC 3	9.72	K130	QLETNSQRDFKVVLLTEVDKL	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	308	HNCDGQLKGEVQAQMA	High	Sumoylation
P35249	RFC 4	10.19					146 - 150	KPCPPFK IVILDEADSMTS	High	SUMO Interaction
P40937	RFC 5	18.61	K194	PRLEHWEEKVDISEDGMKA	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
P27694	RPA 1	1.14	K273	KIANKQFTAVKNDYEMTFNNE	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	449	WKTLYEVKSENLGQG	High	Sumoylation
			K449	NTNWKTLYEKSENLGQGDKP	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	577	FIFRVRVKVETYNDE	High	Sumoylation
			K577	FRSFIFRVRVKETYNDSEIRI	High	Putatif SUMO sites NDSM				
P35244	RPA 3	1.82								
P42677	RPS 27	4.41								
P31350	RR M2	10.41					120	IQHWESLKPEERYFI	High	Sumoylation

P55735	SEC 13	12.88	K62	NILASCSYDRKVII WREENGT	High	Putatif SUMO sites  Strong consensu s inv	2 - 6	*****M VSVIN TVDTSHE	Hig h	SUMO Interacti on
			K285	NILAVGGDNKVTL WKESVDG	High	Putatif SUMO sites  Strong consensu s inv	2 - 6	*****M VSVIN TVDTSHE	Hig h	SUMO Interacti on
							195	DNLIKLVKEEE DGQW	Hig h	Sumoylat ion
							203	EEEDGQWKKEEQ KLEA	Hig h	Sumoylat ion
Q9BVA 8	SGO L1	1.62								
P63208	SKP 1	1.95					16 - 20	SDGEIFE VDVEI AKQSVTI	Hig h	SUMO Interacti on
Q14683	SMC 1A	16.25	K106	RVIVGSGSSEYKINN KVQLHE	High	Putatif SUMO sites  Strong consensu s inv	177	KRKKEVMKAE DTQF	Hig h	Sumoylat ion
			K177	EYDKRKKEVMKAE EDTQFNH	High	Putatif SUMO sites  Extended PDSM	213	ADRYQLKDEV VRAQ	Hig h	Sumoylat ion
			K420	EERKKVETEAKIKQ KLREIEE	High	Putatif SUMO sites  Strong consensu s inv	379	VKKYHRLKEEA SKRA	Hig h	Sumoylat ion
			K579	TFLPLDYLEVKPTD EKLRELK	High	Putatif SUMO sites  Consensu s inv	594 - 598	ELKGAKL VIDVI RYEPPII	Hig h	SUMO Interacti on
			K796	VRNIREFEEKVKR QNEIAKK	High	Putatif SUMO sites  Strong consensu s inv	853	ENEIEKLKKEEQ RHM	Hig h	Sumoylat ion
			K841	DKVHMWEQTVKK DENEIEKLK	High	Putatif SUMO sites  NDSM	1000	AQAEEEEIKQEM NTLQ	Hig h	Sumoylat ion
			K108 1	LKDAQAEEIEIKQE MNTLQQKL	High	Putatif SUMO sites  Extended PDSM	1063	KQAFEQIKKER FDRF	Hig h	Sumoylat ion
			K108 1	KKAKQAFEQIKKER FDRFNAC	High	Putatif SUMO sites  Strong Consensu s	1190	QAIVISLKEEYF TKA	Hig h	Sumoylat ion
			AA 594- 597	RELKGAKLVIDVIR YEPPII	22.411	SIM Type β				
+0953 47	SMC 2	63.1	K246	AYQFLAEDTKVRS AEELKEM	High	Putatif SUMO sites	211	TPTIQKLKEERS SYL	Hig h	Sumoylat ion

						Strong consensus inv				
			K613	VHVALSVEYKPEL QKAMEFV	High	Putatif SUMO sites Consensus inv	722	LKQQWEMKTE EADLL	High	Sumoylation
			K107	GQTVLDGLEFKVAL GNTWKEN	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	830	TLELEELKREHT SYK	High	Sumoylation
							1109 - 1113	LLFKPAP IYILD EVDAAALD	High	SUMO Interaction
Q9UQE 7	SMC 3	11.09	K396	TSKEERDKWIKKEL KSLDQAI	High	Putatif SUMO sites Extended PDSM	285	GTKISAMKEEK EQLS	High	Sumoylation
			K820	ENRQLLNERIKLEG IITRVET	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	396	EERDKWIKKEL KSLD	High	Sumoylation
							778	ESTRESLKAEALG TDL	High	Sumoylation
							820	QLLNERIKLEGI ITR	High	Sumoylation
Q9NTJ3	SMC 4	58.18	K700	TPRLFDLVKVKDEK IRQAFYF	High	Putatif SUMO sites Strong Consensus	468	KEVMDSLKQET QGLQ	High	Sumoylation
			K797	SKKAMQIQEQKVQ LEERVVKL	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	700	LFDLVKVKDEKI RQA	High	Sumoylation
			K998	KEHRNLLQELKVIQ ENEHALQ	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv	1017	DALSILKLEQI DGH	High	Sumoylation
			K108	ALLEARCHEMKPNL GAIAEYK	High	Putatif SUMO sites Consensus inv	1055 - 1059	EDNPIEE ISVLS PEDLEAI	High	SUMO Interaction
							1076 - 1080	PDSITNQ IALLE ARCHEMK	High	SUMO Interaction
Q8NBT 2	SPC 24	5.92								
Q8N3U 4	STA G2	4.75	K121	SKNRRETELKPDF FDPASIM	High	Putatif SUMO sites Consensus inv				
P04183	TK1	11.94					172 - 176	RLGTEKE VEVIG GADKYHS	High	SUMO Interaction
Q9NZD 0	TPS 3	4.55								
P12270	TPR	3.1	K457	AQKAVASLSVKLEQ AMKEIQR	High	Putatif SUMO sites	457	AVASLSVKLEQ AMKE	High	Sumoylation

						Strong Consensus				
			AA 1943 - 1949	DGQKGDDVIVID SDDEED	17.302	SIM Type a	582	KITELQLKLESA LTE	High	Sumoylation
							657 - 661	TVSTPAP VPVIE STEAIEA	High	SUMO Interaction
							785	EVRAENLKKEE MLK	High	Sumoylation
							1139	EERERMLKDEV SKCV	High	Sumoylation
							1379	TEEIGRLKAEIA RSN	High	Sumoylation
							1943 - 1947	GQKGDD VIVID SDDEED	High	SUMO Interaction
Q9ULW0	TPX 2	5.89	K477	LEDVVGPEKKVLPI TVPKSP	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
			K554	DKERQLQKEKKIKE LQKGEVP	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
			K583	HFDTINLPEKKVKN VTQIEPF	High	Putatif SUMO sites Strong consensus inv				
			K641	TVISQEPFVPKKEK KSVAEGL	High	Putatif SUMO sites High consensus PDSM				
Q9BQE3	TUB A1C	8	K304	ACFEPANQMVKCD PRHGKYMA	High	Putatif SUMO sites SUMO-Ac switch				
			AA 114-117	GHYTIGKEIDLVL DRIRKL	14.851	SIM Type β				
P68366	TUB A4A	10	K304	ACFEPANQMVKCD PRHGKYMA	High	Putatif SUMO sites SUMO-Ac switch				
Q13885	TUB B2A	2.4					116 - 120	GAEVDV VLDWV RKESESC	High	SUMO Interaction
Q9BVA1	TUB B2B	9.26					116 - 120	GAEVDV VLDWV RKESESC	High	SUMO Interaction
ENSP0000320295	TUB B3	13.96					116 - 120	GAEVDV VLDWV RKECENC	High	SUMO Interaction
P23258	TUB G1	23.62	K304	ACFEPANQMVKCD PRHGKYMA	High	Putatif SUMO sites SUMO-Ac switch				
			AA 114-117	GHYTIGKEIDLVL DRIRKL	14.851	SIM Type β				



Q9BSJ2	<b>TUB GCP 2</b>	10.51					884 - 888	SQKATPQ VPVLR GPPAPAP	Hig h	SUMO Interacti on
Q96CW 5	<b>TUB GCP 3</b>	5.71	<b>K59</b>	RDEFLVAEKIKKELI RQRREA	High	Putatif SUMO sites  Strong Consensu s	59	FLVAEKIKKELI RQR	Hig h	Sumoylat ion
			<b>K455</b>	EFFVASDPTVKTDR LWHDKYT	High	Putatif SUMO sites  Strong Consensu s	582	RHLMDLLKPEL VRPA	Hig h	Sumoylat ion
O60763	<b>USO 1</b>	22.21					791	SEQVAELKQEL ATLK	Hig h	Sumoylat ion
							861	LQETKELKNEIK ALS	Hig h	Sumoylat ion
							909 - 913	SKKEQDD LLVLL ADQDQKI	Hig h	SUMO Interacti on
Q7Z460	<b>VRK 1</b>	7.33					1424 - 1428	SIHPEQC IKVLC PIIQTAD	Hig h	SUMO Interacti on
Q7ZSK 2	<b>WA PAL</b>	3.94					122 - 126	ANSKISH VWED TWSDKC	Hig h	SUMO Interacti on
							425	TKSKKDVLEFF GFE	Hig h	Sumoylat ion
							676 - 680	QPLNTRC LSVIS LATKCAM	Hig h	SUMO Interacti on
O14980	<b>XPO 1</b>	64.1	<b>K752</b>	QPLIRSMRTVKRET LKLISGW	High	Putatif SUMO sites  Strong Consensu s	133 - 137	YIGKLN ILVQI LKQEWPK	Hig h	SUMO Interacti on
			<b>K957</b>	AYMFNLVEEGKIST SLNPGNP	High	Putatif SUMO sites  Strong consensu s inv	139	MILVQILKQEW PKHW	Hig h	Sumoylat ion
							430 - 434	RMAKP EE VLVE NDQGEV	Hig h	SUMO Interacti on
							752	IRSMRTVKRET LKLI	Hig h	Sumoylat ion
O43264	<b>ZW 10</b>	10.37	<b>K35</b>	SRLTRRVEEIKGEV CNMISKK	High	Putatif SUMO sites  Strong Consensu s	35	TRRVEEIKGEVC NMI	Hig h	Sumoylat ion
							272 - 276	VIESQPN IVIR FESIMTN	Hig h	SUMO Interacti on
							713 - 717	NKKYQEE VPVYV PKWMPFK	Hig h	SUMO Interacti on
Q9H90 0	<b>ZWI LCH</b>	1.32					252	STATLNKVESG EPR	Hig h	Sumoylat ion